

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA

Papel do Interferon- γ na resposta anti-leucemia associada à
Doença Enxerto contra Hospedeiro Experimental

Rômulo Braga Areal

Rio de Janeiro
2009



Rômulo Braga Areal

Papel do Interferon- γ na resposta anti-leucemia associada à
Doença Enxerto contra Hospedeiro Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação desenvolvida na Divisão de Medicina Experimental
da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer

Orientadora: Adriana Bonomo

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA
2009

Rômulo Braga Areal

Papel do Interferon- γ na resposta anti-leucemia associada à
Doença Enxerto contra Hospedeiro Experimental

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Oncologia do Instituto Nacional de
Câncer, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Mestre em Oncologia.

Orientadora: Adriana Bonomo

Rio de Janeiro
2009

Rômulo Braga Areal

Papel do Interferon- γ na resposta anti-leucemia associada à
Doença Enxerto contra Hospedeiro Experimental

Rio de Janeiro, 08 de julho de 2009.

Dr. João Paulo de Biaso Viola

Dra. Maria Bellio

Dra. Claudia Esther Alicia Rocío Hassan

FICHA CATALOGRÁFICA

A678p Areal, Rômulo Braga.

Papel do interferon- γ na resposta anti-leucemia associada à Doença de Enxerto contra Hospedeiro Experimental / Rômulo Braga Areal. - Rio de Janeiro: INCA, 2009.

109 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ), 2009. Orientador: Adriana Bonomo.

1. Transplante de Medula Óssea. 2. Doença Enxerto-Hospedeiro. 3. Efeito Enxerto vs Leucemia. 4. Neoplasia Residual. 5. Linfócitos T 6. Citocinas 7. Interferon Tipo II I. Bonomo, Adriana. II. Título.

CDD 616.994410592

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, por minha vida, e por colocar em meu caminho as pessoas de quem falarei abaixo.

A meus pais, José Antônio e Gildete, por acreditarem em mim, me deixando seguir meu caminho a meu modo e me apoiando sempre. A meu irmão, Romero. Ao amigo, tio e gente boa, Paulo Braga! A toda minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos. À amiga, madrinha e conselheira, Imaculada Dornelas, sem sua ajuda eu com certeza não chegaria aqui.

A meus professores, muitos mais que isso, amigos e companheiros. Ao professor, amigo, conselheiro e tutor, Lucio Campos, que além de me ensinar evolução orgânica, me ensinou a evoluir como estudante, como cientista e como ser humano.

Ao Programa de Educação Tutorial e aos amigos petianos.

À melhor turma de biologia, BIOUFV2003!!! Muito obrigado a todos vocês pelo privilégio e pelo prazer de conviver com pessoas tão inteligentes e capazes, e ao mesmo tempo tão alegres e unidas. Ao grande amigo Júnio Cota, por todos os ensinamentos e companheirismo.

A uma pessoa mais do que especial, Juliane Menezes, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos grandes amigos que conheci no INCA!!! Antigos e novos.

A meus co-orientadores no começo, Julia Farache(cabeçuda!) e Zilton Vasconcelos! Muito obrigado por tudo!! À Aline Benjamin(amigona), Sheila, Poliana, Jessica, Rafaela e Patrícia.

Às quatro pessoas mais procuradas nos momentos difíceis no laboratório: João Luiz, Flávio, João Paulo e Ana Paula!!! JL, muito obrigado pelo apoio e pelas longas conversas, fossem elas sobre protocolos ou sobre futebol!! SRN!! Primo, obrigado pela amizade e por todos os ensinamentos, de vida e científicos!! May the Force be with you!! JP, muito obrigado, principalmente pela paciência, e por toda a ajuda com a patologia!!! Ana Paula, se eu fosse começar a te agradecer tinha que fazer um livro né?! Então, por falta de espaço, um obrigado imenso por todo o apoio e amizade durante todo esse tempo, por toda a dedicação ao ajudar nos experimentos e para manter o laboratório sempre em ordem, e muito obrigado por me aturar todos os dias!!

Aos amigos e companheiros de transplante, Rômulo(Gal) e Ramon (Romão galvani), muito obrigado por toda a ajuda nos experimentos e nos protocolos, e pelos papos animados, científicos ou não!!

Aos amigos Ana Merck(amante das mariposas), Heitor (~~cano~~companheiro de mangá!), Nathalia(~~lesada~~), Isabela(belusca), Luiza(pequeninha), Vivi(catsmile!), Léo(~~páca~~chica) e Douglas(~~páca~~).

À Ana Carolina Leal, amiga extremamente capaz e sempre disposta a ajudar. Muito obrigado por tudo!

Ao Martin Bonamino, por toda a ajuda e contribuição para o trabalho. À Bianca(de Xdifora), Luiza(conterrânea!) e Andressa(doutora).

À Ana Carolina Monteiro, pela grande disposição para ajudar e pela paciência na revisão da dissertação!!

À Andréa, Dona Rose, Cleilton(barrêra!), Fernanda, Thaís e Suely, por toda a dedicação e competência.

A toda a divisão de Biologia Celular. Ao pessoal do Biotério, Márcio, Augusto e Ricardo. Ao setor de radioterapia do INCA, principalmente ao Delano Batista e ao Carlos Aurélio de Oliveira. E aos amigos seguranças do INCA, Sena, Valmir e Vieira, companheiros das madrugadas de experimento!!!

Ao Dr. Marcello Barcinski, pela grande oportunidade de conhecer e fazer parte da MEDEX, e por ser o exemplo de cientista e profissional que guia nossos passos.

À minha orientadora, Adriana Bonomo, pela oportunidade de aprender seu modo de fazer ciência, pela paciência, na medida certa, pelo otimismo, e principalmente pela confiança. Obrigado por não desistir de me ensinar mesmo quando minha teimosia não me deixa ver, e me desculpe pelo meu jeito nada fácil de conviver. Espero que algum dia eu seja um pouco da grande cientista que você é.

“It is amateurs who have one big bright beautiful idea that they can never abandon. Professionals know that they have to produce theory after theory before they are likely to hit the jackpot.”

Francis Crick

RESUMO

A utilização do Transplante alogeneico de Células Tronco Hematopoiéticas para o tratamento de malignidades é em grande parte prejudicada pela ocorrência da Doença Enxerto contra Hospedeiro (DECH). A grande maioria dos esforços para reduzir a incidência da DECH resultou na diminuição do efeito Enxerto contra Leucemia (ECL), com aumento na recaída pós-transplante, sugerindo que os efeitos enxerto contra Hospedeiro (ECH) e ECL estão intimamente ligados. Para separar esses efeitos, é preciso caracterizar os mecanismos imunológicos envolvidos com cada um deles.

Neste trabalho, foi caracterizado um sistema capaz de discriminar e quantificar os efeitos ECH e ECL: hospedeiros BALB/c ou F1(B6XDBA/2) irradiados letalmente receberam medula óssea (MO) de C57BL/6 administrada junto com células T esplênicas de camundongos C57BL/6 normais ou deficientes em Interferon- γ (GKO), acompanhadas de células do mastocitoma P815 expressando GFP. O efeito ECH foi avaliado pela mortalidade, por parâmetros clínicos (peso, pele, diarreia, postura e atividade) e por histopatologia (pele, fígado e intestino), e o efeito ECL foi avaliado pela quantidade de células leucêmicas no sangue, baço, fígado, linfonodos e medula óssea, utilizando-se citometria de fluxo.

Foi verificado que o efeito ECL em órgãos linfóides secundários (OLS) era independente da produção de IFN- γ . No fígado, o efeito ECL foi dependente de IFN- γ apenas quando o efeito ECH era parcial. Na MO, o ECL foi estritamente dependente de IFN- γ , independente da magnitude do ECH. A avaliação da produção de citocinas nos OLS mostrou que as células T aloreativas produziam IL-17A apenas nos receptores de células leucêmicas, independente de IFN- γ . Em contraste com receptores normais, em receptores leucêmicos de células T GKO a patologia intestinal é moderada, e os danos no fígado ocorrem principalmente no parênquima, com preservação dos espaços vasculares.

O efeito ECH observado na ausência de IFN- γ correlaciona-se com o efeito ECL em todos os órgãos avaliados exceto na MO. Esses resultados levantam importantes questões relacionadas ao controle da doença residual mínima e à resposta imune na MO, um santuário de micrometástases. IL-17A, presente apenas em receptores de células leucêmicas e independente de IFN- γ , não foi suficiente para eliminar as células malignas da MO. Nossos resultados sugerem que a resposta anti-tumoral é sítio-específica, provavelmente refletindo diferentes condições ambientais impostas por diferentes órgãos. Nós acreditamos que o estudo dos mecanismos indutores e efetores dos efeitos ECH e ECL, nos diferentes órgãos alvo, nos possibilitará desenvolver novos tratamentos que inibam a DECH enquanto mantenham o efeito ECL.

ABSTRACT

The clinical use of allogeneic stem cell transplantation for cancer treatment is seriously hampered by the occurrence of graft-versus-host disease (GVHD). For the most part, efforts to reduce the incidence of GVHD have also diminished graft-versus-leukemia (GVL) responses, with increased tumor relapse, suggesting that the Graft-versus-Host (GVH) and the GVL effects are intimately linked. To separate these effects, the immunological mechanisms related to each one must be characterized.

In this work, a system able to discriminate and quantify the GVH and GVL effects was characterized: Radiation bone marrow (BM) chimeras were prepared using BM cells from C57BL/6 administered into BALB/c or F1(B6XDBA/2) hosts, together with splenic T cells from C57BL/6 or Interferon- γ (IFN- γ) knockout mice. These chimeras were injected IV with P815 mastocytoma cells transduced with GFP. The GVH effect was evaluated by the mortality rate, clinical parameters (weight, skin, diarrhea, hunching and activity) and histopathology (skin, liver and intestine), and the GVL effect was evaluated by the amount of leukemia cells in the blood, spleen, liver, lymph nodes and bone marrow, using flow cytometry.

It was verified that the GVL effect was present in secondary lymphoid organs (SLOs) regardless IFN- γ production. In the liver, the GVL was dependent on IFN- γ only when the GVH effect was partial. In the BM, the GVL was strictly dependent on IFN- γ , and independent of the GVH magnitude. Evaluation of the cytokine production in SLOs showed that alloreactive T cells produced IL-17A only in leukemic recipients, independently of IFN- γ . By contrast with normal recipients, in leukemic recipients of GKO T cells the intestinal pathology was mild and the liver damage was mainly in the parenchyma, preserving the vascular spaces.

The GVH effect observed in the absence of IFN- γ correlates with the GVL effect in every organ except in the BM. These results raise important questions related to the control of minimal residual disease and the immune response in the BM, a sanctuary of micrometastasis. IL17A, present only in leukemic recipients and independent of IFN- γ , was not enough to eliminate malignant cells from the BM. Our results suggest that the anti-tumor response is site specific, probably reflecting different environmental conditions imposed by different organs. We believe that studying the inductive and effector mechanisms of GVH and GVL effects in different target organs will enable us to design new treatments to prevent GVHD while maintaining the GVL effect.

ABREVIATURAS

aDECH exp.	DECH aguda experimental
AICD	Morte Celular Induzida por Ativação (<i>Activation-Induced Cell Death</i>)
Alo	Alogeneico
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
B10	C57BL/10
B6	C57BL/6
BALB	BALB/c
Bç	Baço
ConA	Concanavalina A
DBA	DBA/2
DECH	Doença Enxerto Contra Hospedeiro
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental (<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>)
ECH	Enxerto Contra Hospedeiro
ECL	Enxerto Contra Leucemia
FasL	ligante de Fas
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GKO	Interferon- γ <i>Knockout</i> (possui o gene que codifica IFN- γ interrompido)
IFN-γ	Interferon- γ
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos (<i>Keratinocyte Growth Factor</i>)
LNs	Linfonodos
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MHC-I	MHC de Classe I
MHC-II	MHC de Classe II
miHAs	<i>minor Histocompatibility Antigens</i>

mLNs	Linfonodos mesentéricos
MO	Medula Óssea
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
pLNs	Linfonodos periféricos
PMN	Polimorfonucleares
PPs	Placas de Peyer
qPCR	PCR quantitativo
semi-Alo	semi-alogeneico
Sg	Sangue
Sin	Singeneico
SLOs	Órgãos Linfóides Secundários - <i>Secondary Lymphoid Organs</i>
Sv	Selvagem
TCR	Receptor de Célula T (<i>T Cell Receptor</i>)
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante-β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
Th	<i>T helper</i> (célula T auxiliadora)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose relacionado a TNF (<i>TNF-related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
Treg	T reguladora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) alogeneico e a Doença Enxerto Contra Hospedeiro (DECH).....	14
1.2. Modelos Experimentais de DECH	18
1.3. Modelos Experimentais de avaliação do efeito ECL.....	22
1.4. Patofisiologia da DECH.....	24
1.5. Mecanismo dos efeitos ECH e ECL.....	32
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS e MÉTODOS	36
3.1. Animais	36
3.2. Meio de cultura.....	36
3.3. Contagem de células.....	36
3.4. Linhagens celulares.....	37
3.5. Ensaio para detecção de micoplasma	37
3.6. Obtenção de células de Medula Óssea, Baço, Linfonodos, Fígado e Sangue	38
3.7. Lise de hemácias	38
3.8. Depleção de células T por complemento	39
3.9. Ativação de linfócitos T <i>in vitro</i>	40
3.10. Anticorpos e citometria	40
3.10.1. Detecção de moléculas de superfície	40
3.10.2. Detecção de citocinas intracelulares.....	40
3.11. Transplante de Medula Óssea	41
3.11.1. Preparação dos grupos	41
3.11.2. Irradiação	42
3.11.3. Transplante – Indução de DECH	42
3.12. Avaliação da DECH aguda experimental.....	43
3.12.1. Mortalidade	43
3.12.2. Sistema de Escore Clínico	43
3.12.3. Sistema de Escore Histopatológico	44
3.13. Detecção de células P815GFP.....	47
3.14. Análises estatísticas	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Modelo de DECH aguda experimental: aspectos quantitativos na avaliação da doença	49
4.2. Modelo quantitativo de resposta ECL	55
4.3. Papel do IFN- γ na aDECH exp.	61
4.4. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp.	67
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES	96
7. BIBLIOGRAFIA	97
8. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) alogeneico e a Doença Enxerto Contra Hospedeiro (DECH)

O TCTH alogeneico é utilizado majoritariamente como forma de tratamento para malignidades hematológicas e desordens sanguíneas herdadas ou adquiridas. Neste transplante, os pacientes passam por um regime de condicionamento que consiste em quimioterapia e/ou radioterapia, com o intuito de imunossuprimir o hospedeiro para evitar a rejeição do enxerto e, quando usado para tratamento de câncer, reduzir o número de células malignas. Segue-se a este procedimento a infusão de células tronco hematopoiéticas de medula óssea, de sangue de cordão umbilical ou de sangue periférico [neste caso mobilizadas da medula óssea para a periferia através de tratamento prévio com o Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF)]. Essas fontes são enriquecidas em progenitores hematopoiéticos, porém também contêm outros tipos celulares, incluindo células T e B maduras. As células T promovem uma enxertia hematopoiética mais rápida, reconstituem a imunidade T e exercem um potente efeito anti-tumoral, e como na maioria das vezes o transplante é realizado para tratamento de leucemias, esse efeito é comumente denominado efeito Enxerto Contra Leucemia (ECL). Contudo, essas células também iniciam um amplo ataque aos tecidos do hospedeiro, que se manifesta na forma da Doença Enxerto Contra Hospedeiro (DECH), a principal intercorrência do TCTH (Appelbaum, 2003; Welniak, Blazar *et al.*).

Na Clínica, a DECH apresenta-se na forma aguda e na forma crônica (Appelbaum, 2003). Durante muitos anos o diagnóstico dessas formas se baseava no período pós-transplante das manifestações clínicas. Até 100 dias pós-transplante eram diagnosticadas como DECH aguda e após este período como crônica. No entanto, este conceito mudou e recentemente a classificação se baseia nos sinais e sintomas que caracterizavam as formas clássicas de apresentação precoce e tardia, pois parecem ser entidades nosológicas distintas.

A incidência da DECH aguda varia de 30 a 70%, e essa forma é caracterizada pela presença de exantema maculo-papular, geralmente nas palmas das mãos e solas dos pés, seguido de diarreia, freqüentemente com dor abdominal, e doença hepática, associada com o aumento de bilirrubina e fosfatase alcalina no soro; biópsias de pele, intestino e fígado são utilizadas para o diagnóstico da doença (Appelbaum, 2003). De 20 a 40% dos pacientes que sobrevivem por mais de seis meses após o transplante desenvolvem DECH crônica, uma forma que se assemelha a doenças autoimunes sistêmicas, com acometimento de olhos, pulmão, sistema hematopoiético, trato gastro-intestinal, músculos esqueléticos, fígado e órgãos genitais (Appelbaum, 2003).

A imunobiologia da DECH é extremamente complexa e os estudos clínicos são de difícil interpretação, uma vez que os mesmos apresentam resultados muito variados e muitas vezes conflitantes (Tanaka, Imamura *et al.*, 1997; Liem, Van Houwelingen *et al.*, 1998; Takatsuka, Takemoto *et al.*, 1999; Min, Lee *et al.*, 2001; Sakata, Yasui *et al.*, 2001; Antin, Weisdorf *et al.*, 2002; Remberger, Jaksch *et al.*, 2003; Visentainer, Lieber *et al.*, 2003). Essas variações são conseqüência da influência de muitos fatores no desenvolvimento da doença, como o regime de condicionamento, a doença de base, o tipo de transplante, polimorfismos em genes relacionados à resposta imune no doador

e/ou receptor (Middleton, Taylor *et al.*, 1998; Cavet, Dickinson *et al.*, 2001; Elmaagacli, Koldehoff *et al.*, 2006), medicação imunossupressora e presença de infecções pré e pós-transplante (Deeg, 2001). Além disso, as citocinas e fatores estudados são em sua grande maioria mensurados no soro dos pacientes, o que reduz consideravelmente a precisão de tais medidas, uma vez que muitos fatores são produzidos diretamente nos tecidos e apresentam baixa estabilidade no soro (Tanaka, Imamura *et al.*, 1997; Liem, Van Houwelingen *et al.*, 1998; Takatsuka, Takemoto *et al.*, 1999; Deeg; Min, Lee *et al.*, 2001; Sakata, Yasui *et al.*, 2001; Antin, Weisdorf *et al.*, 2002; Remberger, Jaksch *et al.*, 2003; Visentainer, Lieber *et al.*, 2003).

Para diminuir o risco de DECH, os pacientes recebem medicamentos imunossupressores, que diminuem a função de células T, ou recebem enxertos depletados dessas células. Entretanto, essas medidas aumentam o tempo necessário para a reconstituição imune do paciente, elevando o risco de infecções, e diminuem o efeito ECL (Appelbaum, 2001; 2003; Welniak, Blazar *et al.*, 2007). Dados clínicos (Appelbaum) e experimentais (Imado, Iwasaki *et al.*) mostram uma intrincada relação entre os efeitos enxerto-contra-hospedeiro (ECH) e ECL. Pacientes que desenvolvem as formas aguda e crônica da DECH apresentam um risco de recaída de leucemia menor que aqueles que desenvolvem apenas a forma aguda ou não apresentam doença, e os que recebem transplantes de gêmeos idênticos ou depletados de células T apresentam as maiores taxas de recaída (Appelbaum). Estratégias para evitar a DECH devem, portanto, não alterar o estabelecimento de quimerismo e reconstituição imune do paciente, devido ao risco de infecções, e manter o efeito ECL, devido ao risco de recaída. Para avaliar estes aspectos, os modelos experimentais de DECH são cruciais por permitirem a experimentação controlada e a sistemática avaliação de diferentes

aspectos dos resultados (Appelbaum; Welniak, Blazar *et al.*), uma vez que a interpretação dos dados clínicos é dificultada pela grande variabilidade de aspectos envolvidos, como citado acima.

1.2. Modelos Experimentais de DECH

Existe uma grande diversidade de modelos experimentais para o estudo da DECH, com diversas combinações de linhagens isogênicas de camundongos e variadas condições de indução da doença. A **Tabela 1** mostra alguns exemplos dessas combinações de linhagens utilizadas no estudo da DECH experimental.

Doador		Receptor		Disparidade			Ref.
Nome	MHC	Nome	MHC	MHC-I	MHC-II	miHAs	
A/J	H-2 ^a (K ^k I ^k D ^d)	B10	H-2 ^b (K ^{b1} I ^b D ^b)	++	++	++	(Sykes, Abraham <i>et al.</i> , 1993)
B6	H-2 ^b (K ^{b1} I ^b D ^b)	BALB	H-2 ^d (K ^{d1} I ^d D ^d)	++	++	++	(Murphy, Welniak <i>et al.</i> , 1998)
BALB	H-2 ^d	B6	H-2 ^b	++	++	++	(Murphy, Welniak <i>et al.</i> , 1998)
B6	H-2 ^b	F1 (B6 x BALB)	H-2 ^{bxd}	+	+	+	(Vasconcelos, Dos Santos <i>et al.</i> , 2006)
B6	H-2 ^b	F1 (B6 x DBA)	H-2 ^{bxd}	+	+	+	(Teshima, Hill <i>et al.</i> , 1999)
B6.bm1	H-2 ^{bm1} (K ^{bm1} I ^b D ^b)	B6	H-2 ^b	+	-	-	(Krenger, Snyder <i>et al.</i> , 1995)
B6.bm12	H-2 ^{bm12} (K ^{b1} I ^{A^{bm12}} I ^{E^b} D ^b)	B6	H-2 ^b	-	+	-	(Krenger, Snyder <i>et al.</i> , 1995)
C3H.SW	H-2 ^b (K ^{b1} I ^b D ^b)	B6	H-2 ^b	-	-	++	(Murphy, Whitaker <i>et al.</i> , 1991)

Tabela 1. Alguns modelos de DECH experimental. Abreviações: C57BL/10 (B10); C57BL/6 (B6); BALB/c (BALB); DBA/2 (DBA); Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC); MHC de Classe I (MHC-I); MHC de Classe II (MHC-II); *minor Histocompatibility Antigens* (miHAs); Referência (Ref.)

Um pouco menos variada é a forma de avaliação do efeito ECL associado ao efeito ECH (**Tabela 2**), sendo mais comum a utilização de tumores transplantáveis de origem hematopoiética infundidos antes ou depois do regime de condicionamento, mas também com variadas formas de leitura do resultado. Por isso, antes que os diversos estudos da vasta literatura acerca da DECH experimental possam ser interpretados, e a extrapolação de resultados dos modelos experimentais para a clínica possa ser confiável, aspectos importantes devem ser considerados (Welniak, Blazar *et al.*), sendo alguns deles:

a) presença, intensidade e tipo de regime de condicionamento utilizado para preparar o recipiente: em estudos com camundongos o uso de radiação como condicionamento é o mais comum, podendo variar de uma dose letal a uma não-letal (não-mieloablativo); alguns estudos não utilizam regime de condicionamento. O tipo de condicionamento influencia diretamente o nível de danos teciduais e a indução de mediadores pró-inflamatórios, que por sua vez influenciam no curso da doença (Hill, Crawford *et al.*, 1997);

b) a disparidade imunológica entre doador e receptor: que vão desde diferenças no Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) e em produtos protéicos de genes polimórficos apresentados por MHC (*minor Histocompatibility Antigens* – miHAs) a diferenças genéticas fora do MHC ou miHAs inerentes das linhagens utilizadas;

c) o tecido de origem, a pureza e o número de células imune do doador infundidas: normalmente células de baço ou linfonodos são usadas para induzir DECH na maioria dos modelos experimentais murinos. Células T de

tecidos diferentes têm padrões de migração diferentes, e a relação entre subtipos de células T, NKT e NK variam conforme o tecido utilizado, o que pode afetar os efeitos ECH e ECL. A presença no enxerto de células não-linfóides, como precursores e supressores mielóides, também pode afetar esses efeitos (Vasconcelos, Dos Santos *et al.*, 2006; Morecki, Gelfand *et al.*, 2008);

d) a microflora endógena e a presença ou ausência de infecções oportunistas na colônia de animais utilizada: os níveis de microorganismos na colônia animal e o uso de antibióticos como profilaxia pode alterar as respostas imunológicas na DECH, bem como a sensibilidade e a resposta ao regime de condicionamento (Van Bakkum, Roodenburg *et al.*, 1974; Vossen, Heidt *et al.*, 1990);

e) idade dos doadores e receptores: normalmente camundongos adultos jovens são utilizados, com idade variando de 8 a 12 semanas. A idade influencia na sensibilidade ao regime de condicionamento, bem como na resposta ao mesmo (Hakim, Fowler *et al.*, 2001).

Outra fonte de variação são os parâmetros avaliados como indicativos da doença. Alguns estudos utilizam apenas a mortalidade associada à DECH como leitura (Van Bakkum, Roodenburg *et al.*, 1974), outros apenas alterações patológicas em alguns dos tecidos alvo da doença (Mowat, 1989). Já estudos mais completos avaliam também parâmetros fisiológicos, como perda de peso, alterações no pêlo e na pele, postura, atividade e presença de diarreia (Yi, Zhao *et al.*, 2008). Nas análises de patologia, outra fonte de variação é o tempo após o transplante em que são realizadas, uma vez que alguns grupos avaliam as alterações patológicas teciduais em um mesmo momento

pós-transplante e outros avaliam após a morte dos animais. Entretanto, apesar das dificuldades de comparação entre os diversos estudos, a grande variedade de parâmetros e aspectos fisiológicos avaliados nos modelos experimentais fornece um conhecimento mais aprofundado sobre as diferentes apresentações da DECH, e a maior parte dos resultados encontrados nesses modelos podem ser relacionados com as manifestações clínicas da doença (Welniak, Blazar *et al.*, 2007).

1.3. Modelos Experimentais de avaliação do efeito ECL

Os modelos atuais de ECL consistem na administração endovenosa de tumores transplantáveis de origem hematológica, pré ou pós-transplante. A avaliação da resposta anti-tumoral é feita, na maioria das vezes, pela presença ou ausência de nódulos tumorais macroscópicos e pela mortalidade dos animais. Os modelos mais comuns estão citados na **tabela 2**.

Tumor	Tipo	Origem	MHC	Modelo de DECH		Ref.
				Doador	Receptor	
A20	Linfoma B	BALB	H-2 ^d	B6	BALB	(Kappel, Goldberg <i>et al.</i> , 2009)
C1498	Leucemia mielóide	B6	H-2 ^b	BALB	B6	(Sun, Welniak <i>et al.</i> , 2004)
EL-4	Linfoma T	B6	H-2 ^b	BALB	B6	(Yang, Qi <i>et al.</i> , 2002)
P815	Mastocitoma	DBA	H-2 ^d	B6	F1(B6 x DBA)	(Teshima, Hill <i>et al.</i> , 1999)

Tabela 2. Modelos de ECL

Dentre esses, os modelos que utilizam as linhagens EL-4 (Sykes, Abraham *et al.*, 1993; Yang, Sergio *et al.*, 1997; Yang, Qi *et al.*, 2002) e P815 (De La Selle, Riche *et al.*, 1999; Hill, Teshima *et al.*, 1999; Krijanovski, Hill *et al.*, 1999; Pan, Teshima *et al.*, 1999; Teshima, Hill *et al.*, 1999; Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Cooke, Gerbitz *et al.*, 2001; Wang, Shaw *et al.*, 2002; Clouthier, Cooke *et al.*, 2003; Imado, Iwasaki *et al.*, 2004) têm um grande emprego em estudos que visam comparar os efeitos ECL e ECH. O modelo que utiliza a linhagem EL-4 tem como característica um efeito ECL independente de

células T CD4⁺, porém estritamente dependente de células T CD8⁺ e de células esplênicas que não são células T, uma vez que a infusão de células esplênicas depletadas de células T CD4⁺ protege os animais receptores da morte associada ao tumor, e isso não ocorre quando essas mesmas células são depletadas também de células T CD8⁺ ou quando células T CD8⁺ purificadas são infundidas (Yang, Qi *et al.*, 2002). Já o modelo que utiliza a linhagem P815 tem um efeito ECL dependente de células T CD4⁺, de células T CD8⁺ e também de células esplênicas que não são células T (Teshima, Hill *et al.*, 1999). Esta dependência de células diferentes de células T pode estar associada a uma cooperação com células NK ou com células apresentadoras de antígeno (*Antigen Presenting Cells* – APCs) residentes no baço, porém essa relação ainda não foi definida nesses modelos. Células P815 não são susceptíveis à apoptose mediada por TNF- α (Tsukada, Kobata *et al.*, 1999) e expressam níveis normais de Fas (CD95) e MHC-I na membrana celular, sendo susceptíveis à lise mediada por células T citotóxicas e por FasL (CD95L – ligante de Fas) expresso em membranas (Tsukada, Kobata *et al.*, 1999), mas não por anticorpos anti-Fas (Teshima, Hill *et al.*, 1999).

1.4. Patofisiologia da DECH

Os modelos experimentais forneceram então a base para o entendimento dos mecanismos imunológicos responsáveis pela DECH e efeito ECL. A DECH é uma doença complexa, que se desenvolve em múltiplos estágios, resultante do reconhecimento de um hospedeiro geneticamente diferente pelas células T do doador (**Figura 1**) (Welniak, Blazar *et al.*, 2007).

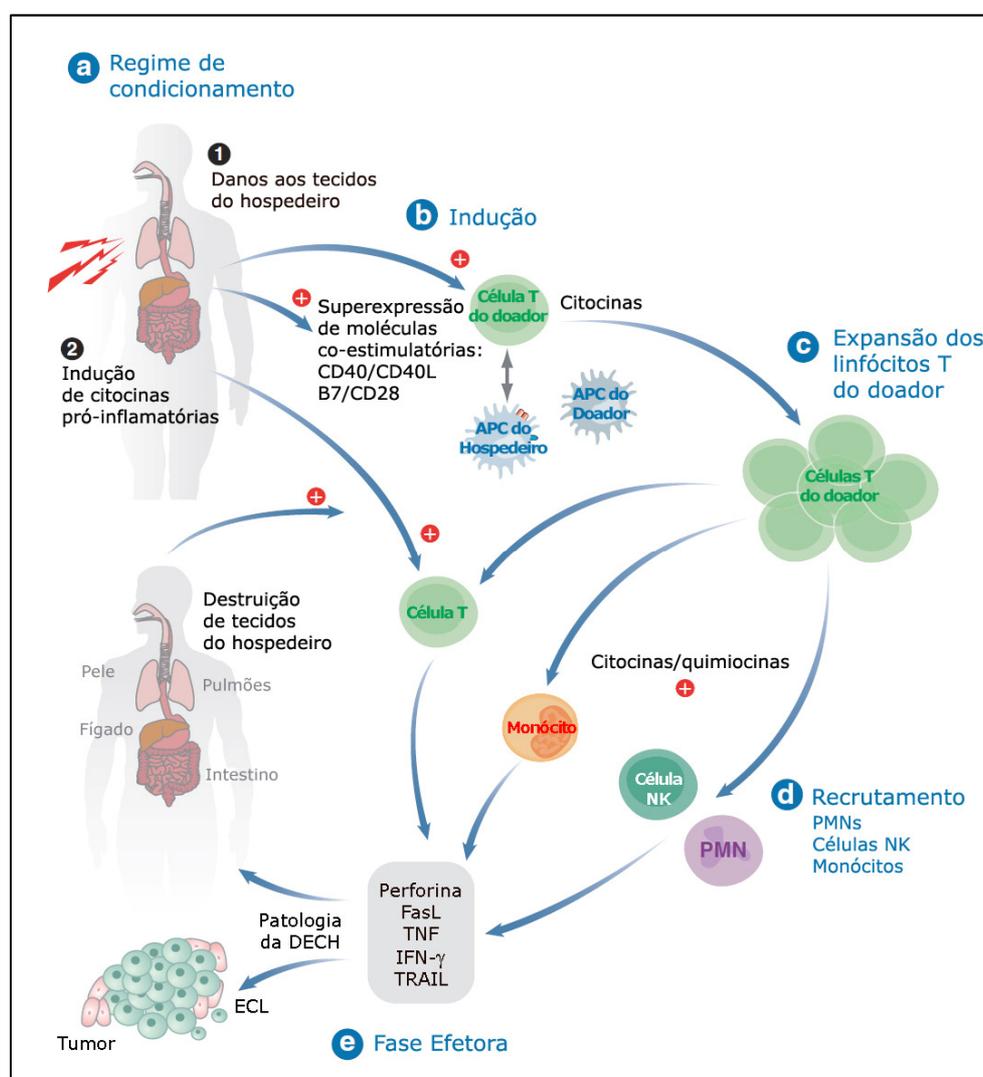


Figura 1. Patofisiologia da DECH (Welniak, Blazar *et al.*, 2007). Abreviações: Polimorfonucleares (PMN); *Natural Killer* (NK); Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* – TNF); Ligante Indutor de Apoptose relacionado a TNF (*TNF-related apoptosis inducing ligand* – TRAIL).

O primeiro estágio é resultante de danos teciduais causados pelo regime de condicionamento. Os tecidos com maior taxa proliferativa são os mais sensíveis, sendo o epitélio intestinal um dos mais lesados durante o condicionamento. Danos a este epitélio, que depende de uma renovação constante para manter-se como uma barreira à microflora intestinal, permitem a entrada de microorganismos na mucosa intestinal, com a conseqüente ativação de células da imunidade inata através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs) presentes nesses microorganismos. Essa ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias em APCs. Evidências experimentais que suportam este modelo vêm de estudos onde a dose de radiação utilizada é aumentada gradativamente, o que causa uma DECH mais severa, associada a maiores níveis séricos de Lipopolissacarídeo (LPS) e maior produção de citocinas pró-inflamatórias (Hill, Crawford *et al.*, 1997). Além disso, modelos experimentais de DECH que não utilizam regime de condicionamento não resultam em mortalidade associada à doença, nem em danos patológicos sistêmicos e perda de peso (Hakim, Fowler *et al.*, 2001), resultados que são substituídos por rápida mortalidade quando LPS a uma dose sub-letal é infundido pós-transplante nos receptores de células T alogeneicas (Nestel, Price *et al.*, 1992). O tratamento do hospedeiro com agentes protetores do epitélio, como o Fator de Crescimento de Queratinócitos (Keratinocyte Growth Factor – KGF), impedem o aumento sérico de LPS e TNF- α e protegem da DECH (Krijanovski, Hill *et al.*, 1999). Animais criados em situação de mínimo contato possível com microorganismos (*germfree*) têm pouca ou nenhuma DECH quando recebem transplante alogeneico. (Van Bekkum, Roodenburg *et al.*, 1974). Porém, a inflamação e ativação resultantes

apenas do regime de condicionamento não causam a mortalidade e os efeitos patológicos da DECH, uma vez que receptores de células T singeneicas sobrevivem normalmente pós-transplante. Essa ativação, inflamação e danos são amplificados se células T de um doador alogeneico são transplantadas, em um processo que é iniciado pela interação dessas células com APCs do hospedeiro devidamente ativadas (Shlomchik, Couzens *et al.*, 1999). Essa interação é caracterizada como o segundo estágio.

No segundo estágio ocorre a ativação das células T do doador pelas APCs do hospedeiro, o que resultará na expansão dessas células T no próximo estágio. Através da interação entre o Receptor de Célula T (*T Cell Receptor* – TCR) e moléculas co-estimulatórias, as células T do doador que reconhecem o MHC alogeneico ou miHAs apresentados pelas APCs do hospedeiro são ativadas e polarizadas. A ativação e polarização são influenciadas, respectivamente, pelo perfil de moléculas co-estimulatórias expressas pelas APCs e pelas citocinas existente no sítio de ativação. Esse processo pode gerar clones tanto reguladores quanto indutores de doença (Figura 2).

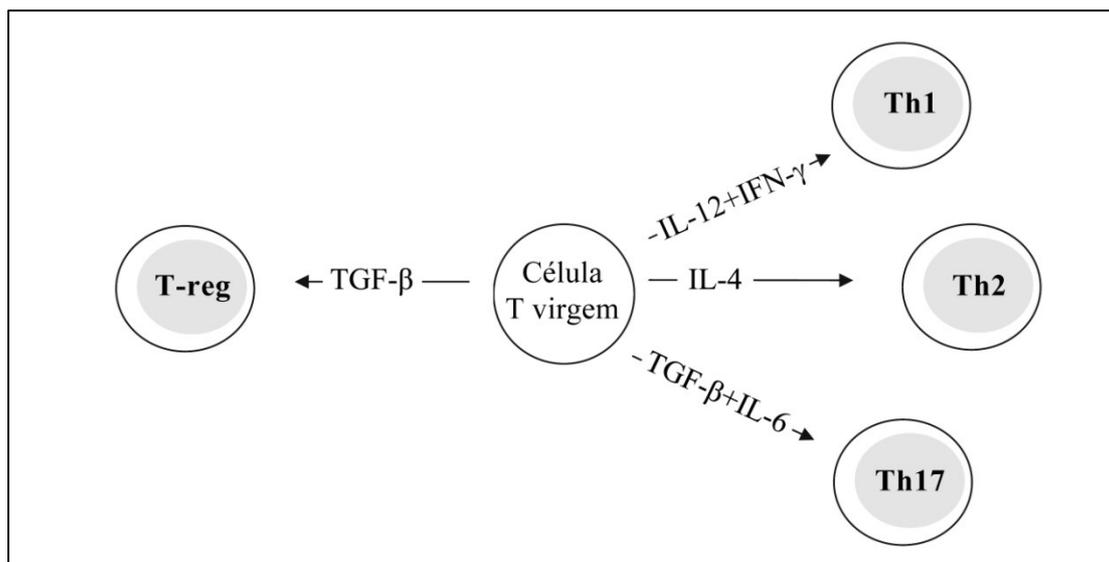


Figura 2. Diferenciação de células T (Awasthi, Murugaiyan *et al.*, 2008). Abreviações: T helper (T_H); T reguladora (T-reg); Fator de Crescimento Transformante- β (Transforming Growth Factor- β - TGF- β).

Além de influenciar a diferenciação das células T, as APCs também influenciam o repertório de moléculas relacionadas à migração expresso por essas células (Bromley, Mempel *et al.*, 2008). Juntamente com os fatores produzidos por cada perfil de diferenciação celular, esse repertório molda o curso da DECH, por ditar para quais tecidos as células T ativadas irão se direcionar e quais células efetoras elas irão recrutar para os mesmos, processos que ocorrerão no quarto estágio da DECH (Welniak, Blazar *et al.*, 2007; Bromley, Mempel *et al.*, 2008).

A diversidade de perfis de diferenciação apresentados na **Figura 2** mostra a plasticidade da resposta de células T. A definição dos fatores que levam à diferenciação para cada um desses subtipos está em constante alteração na literatura, além de existem dados mostrando que essa diferenciação não é absoluta (Lee, Turner *et al.*, 2009). Uma intrincada rede de regulação existe entre todos os perfis, com uma complexa relação no que se refere à produção de citocinas, expressão de receptores, sinalização intracelular e expressão gênica (Awasthi, Murugaiyan *et al.*, 2008; Bromley,

Mempel *et al.*, 2008; Dong, 2008; Mills, 2008; Lee, Turner *et al.*, 2009). De modo simplificado, células T CD4 virgens ativadas na presença de IL-12 e Interferon- γ (IFN- γ) diferenciam-se em células Th1 e produzem IFN- γ e IL-2. IL-4 induz a diferenciação Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13. TGF- β e IL-6 induzem células Th17, que produzem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Quando apenas TGF- β está presente, células T virgens diferenciam-se em células T reguladoras (Treg). IFN- γ inibe a diferenciação de Th2 e Th17, IL-4 inibe Th1 e Th17, TGF- β inibe Th1 e Th2, e IL-6 inibe a diferenciação de Treg. O processo de diferenciação irá, portanto, depender de um balanço entre essas citocinas presentes no microambiente de ativação das células T (Awasthi, Murugaiyan *et al.*, 2008; Bromley, Mempel *et al.*, 2008; Dong, 2008; Mills, 2008; Lee, Turner *et al.*, 2009). Além disso, as citocinas produzidas e suas vias de inter-regulação influenciam a magnitude da expansão das células T alogeneicas no estágio seguinte da DECH.

No terceiro estágio há uma grande expansão das células T alogeneicas nos órgãos linfóides secundários (*Secondary Lymphoid Organs* - SLOs) do hospedeiro. Baço, linfonodos periféricos (pLNs – linfonodos cervicais, axilares, inguinais, etc.), linfonodos mesentéricos (mLNs) e placas de Peyer (PPs) são infiltrados por células T do doador logo após sua infusão, e tornam-se o sítio de ativação, polarização e expansão dessas células. Essa expansão é acompanhada por uma grande produção de citocinas e expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas, que definirão o padrão de migração das células T ativadas (Wysocki, Panoskaltis-Mortari *et al.*, 2005; Welniak, Blazar *et al.*, 2007). Estudos recentes mostraram que o bloqueio da entrada dessas células nos SLOs impede o desenvolvimento da DECH, porém cada um deles é capaz de ativar e expandir células T aloreativas independentemente, e só o bloqueio do acesso a todos ao mesmo tempo evita a doença (Beilhack, Schulz *et al.*, 2008). Nos

SLOs, células T CD4⁺ aloreativas proliferam constantemente desde sua entrada, atingindo níveis mais altos entre os dias 3 e 6 pós-transplante (Beilhack, Schulz *et al.*, 2005). Células T CD8⁺ expandem rapidamente entre os dias 3 e 5. O estágio seguinte da DECH é iniciado quando as células T ativadas saem dos SLOs e migram para os tecidos alvo da DECH, o que ocorre no dia 4 para as células T CD4⁺ e no dia 6 para as células T CD8⁺ (Beilhack, Schulz *et al.*, 2005). Após a expansão, um período de contração da população de células T ativadas é observado nos SLOs, entre os dias 5 e 7, com eliminação de grande parte dessas células por Morte Celular Induzida por Ativação (*Activation-Induced Cell Death - AICD*), em um processo mediado por Fas/FasL e dependente de IFN- γ .

No quarto estágio, as células T ativadas nos SLOs migram para os tecidos alvo da DECH: intestino, fígado, pele e, em menor escala, pulmões. Estudos recentes utilizando células T bioluminescentes mostraram que 6 dias pós-transplante já há grande infiltração de células T do doador nos intestinos e fígado do hospedeiro, no entanto a pele e outros órgãos são atingidos mais tardiamente (Beilhack, Schulz *et al.*, 2005). Foi mostrado que células T ativadas em qualquer dos SLOs quando transferidas para outro hospedeiro condicionado migram inicialmente para o fígado e intestino, e só tardiamente para a pele, mesmo com baixa expressão de moléculas de padrão migratório para esses órgãos (Beilhack, Schulz *et al.*, 2008). Entretanto, apesar da existência de uma ampla variedade de moléculas relacionadas com a migração de células T, somente quatro foram avaliadas nesse estudo (ligantes de P-selectina, ligantes de E-selectina, $\alpha 4\beta 7$ e CCR9), o que não exclui a possibilidade de outras moléculas de migração, relacionadas ao tráfego para o fígado e o intestino, serem expressas por essas células. Além disso, sabe-se que pode ocorrer a ligação de

múltiplas quimiocinas a um determinado receptor, e até mesmo a ligação de vários receptores a uma determinada quimiocina (Wysocki, Panoskaltsis-Mortari *et al.*, 2005; Bromley, Mempel *et al.*, 2008). Contudo, ainda não foi determinado se o padrão de migração das células T ativadas é definido pelo nível de inflamação nos tecidos, que é maior no fígado e intestino inicialmente, ou pelo conjunto de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão expressos por essas células.

A produção de citocinas inflamatórias nos tecidos, por sua vez, induz a expressão de quimiocinas nos mesmos, um processo crítico para o desenvolvimento da DECH. O bloqueio de algumas dessas citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β , evita a doença por impedir a migração de células T aloreativas para o fígado e o intestino, sem influenciar a expansão dessas células nos SLOs (Teshima, Ordemann *et al.*, 2002). Durante os processos de expansão, migração e infiltração das células T aloreativas, um mecanismo de amplificação da produção de citocinas inflamatórias ocorre. Células T produzem citocinas ativadoras da imunidade inata, como IFN- γ , que intensifica a liberação de citocinas inflamatórias por macrófagos, por exemplo. Além disso, as células T ativadas também secretam citocinas inflamatórias. Como resultado, os tecidos infiltrados pelas células T aloreativas tornam-se locais de grande inflamação, e expressam quimiocinas que recrutam monócitos, células NK e Polimorfonucleares (PMNs), células que também produzem mediadores inflamatórios. As elevadas concentrações de moléculas e células inflamatórias nesses tecidos causam então os danos associados à DECH, no quinto estágio que é denominado de fase efetora. Os mecanismos responsáveis por esses danos são classificados como efetores da resposta anti-hospedeiro, e alguns deles também participam do efeito ECL.

Na fase efetora da DECH, danos teciduais são causados por moléculas solúveis, como TNF- α , IFN- γ e Ligante Indutor de Apoptose relacionado a TNF (*TNF-related apoptosis inducing ligand* – TRAIL), e por moléculas associadas a células efetoras, como perforina/granzima e FasL. Esses danos amplificam o processo inflamatório, o que mantém e aumenta o processo histopatológico da DECH, resultando nos processos fisiopatológicos da doença: diarreia, perda de pêlo, desenvolvimento de lesões ulcerativas na pele e caquexia (anorexia, anemia e perda de massa muscular, que resulta em perda de peso, fraqueza e redução de mobilidade) (Piguet, Grau *et al.*, 1987; Sun, Tawara *et al.*, 2007; Welniak, Blazar *et al.*, 2007).

1.5. Mecanismo dos efeitos ECH e ECL

Os mecanismos efetores da resposta anti-hospedeiro são realizados basicamente por citocinas inflamatórias e pelos sistemas perforina/granzima e Fas/FasL. A contribuição desses mecanismos para o efeito ECH exercido por células T CD4⁺ ou CD8⁺ está ilustrada na **Figura 3**.

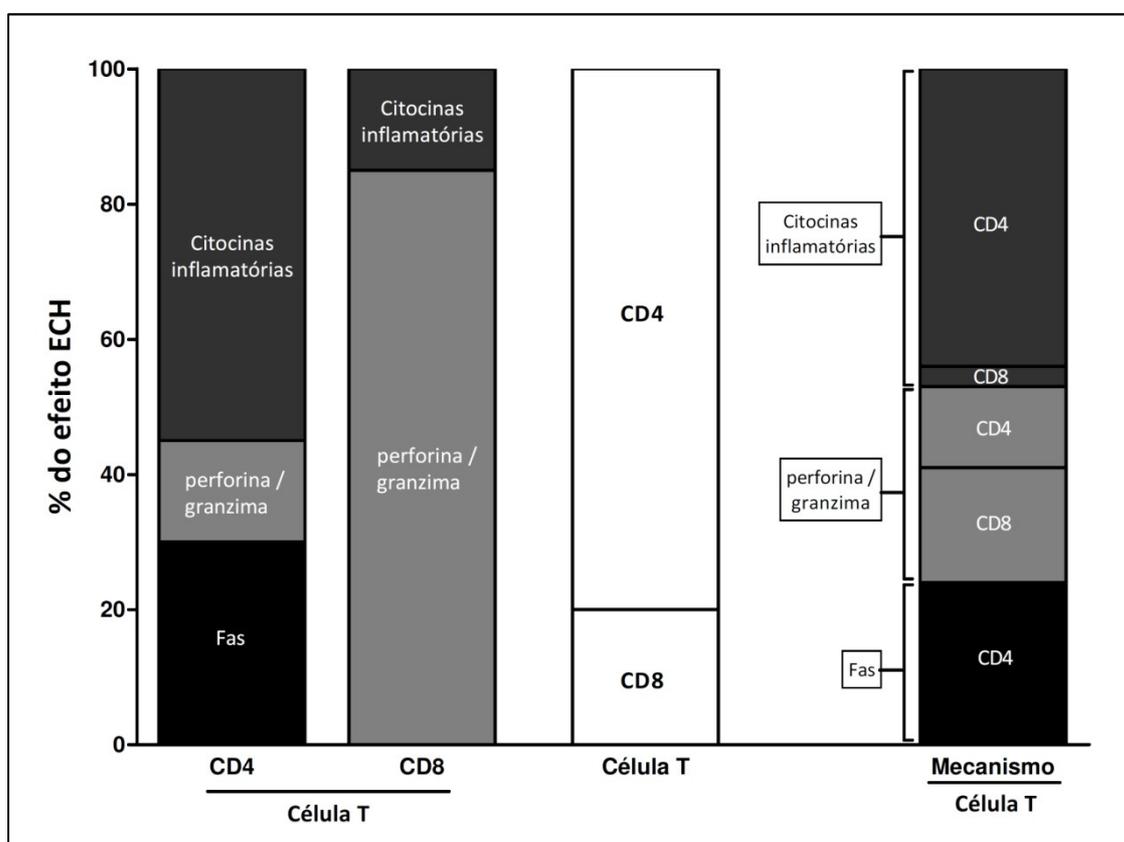


Figura 3. Contribuição dos mecanismos efetores para o efeito ECH mediado por células T (Graubert, Dipersio *et al.*, 1997).

Dentre as citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1 β se destacam por participarem desde cedo do processo de ativação da resposta e aumento da inflamação. A DECH pode ser inibida através do bloqueio de TNF- α e IL-1 β , porém o tratamento deve ser

iniciado antes do transplante e ocorrer durante todo o processo. O bloqueio de apenas uma das duas citocinas, entretanto, não apresenta qualquer efeito (Teshima, Ordemann *et al.*, 2002). Esses fatos mostram a predominância dessas citocinas inflamatórias durante todo o curso da doença. TNF- α é a citocina responsável pela caquexia associada à DECH (Piguet, Grau *et al.*, 1987; Tracey, Wei *et al.*, 1988) e IL-1 β participa do processo de ativação e polarização de células T (Welniak, Blazar *et al.*, 2007).

Tanto células T CD4⁺ quanto células T CD8⁺ podem usar a via de perforina/granzima para lisar as células do hospedeiro, por um mecanismo dependente da interação com moléculas de MHC. Entretanto, esse mecanismo é muito mais importante para o efeito mediado por células T CD8⁺, pois quando as mesmas são deficientes de perforina ou granzima causam uma menor mortalidade associada à DECH, o que não ocorre com células T CD4⁺ (Graubert, Dipersio *et al.*, 1997).

Células T podem também utilizar a via de Fas-FasL como mecanismo citotóxico (Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Schmaltz, Alpdogan *et al.*, 2001). Hospedeiros deficientes da molécula Fas apresentam uma DECH mais severa, associada a uma maior expansão de células T devido à perda do principal mecanismo de AICD. Apesar disso, esses animais desenvolvem uma doença hepática mais branda, o que evidencia um papel importante da via de Fas na patologia do fígado associada à DECH (Van Den Brink, Moore *et al.*, 2000). Células T deficientes em FasL induzem menos DECH (Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Schmaltz, Alpdogan *et al.*, 2001).

Os mecanismos efetores do efeito ECL são os mesmos do efeito ECH, com exceção da via de Fas, que parece ser dispensável para esse efeito na maioria dos modelos (Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Schmaltz, Alpdogan *et al.*, 2001). A dependência de

células T CD4⁺ varia de acordo com o modelo de ECL, mas em todos há dependência de células T CD8⁺ e da via de perforina/granzima. IL-1 β é dispensável para o efeito ECL (Hill, Teshima *et al.*, 1999), porém TNF- α parece ser indispensável. O bloqueio de TNF- α *in vivo* inibe o efeito ECL, pois evita a geração eficiente de células T citotóxicas (Hill, Teshima *et al.*, 1999). Células T deficientes em TNFR1 (p55) exercem um efeito ECL menor, o que sugere um papel direto de TNF- α sobre essas células (Hill, Teshima *et al.*, 1999; Tsukada, Kobata *et al.*, 1999).

Não está claro se os efeitos ECH e ECL podem ser separados, para que se possa inibir a DECH e promover a eliminação da malignidade. Células T CD4⁺ participam mais do ECH, enquanto células T CD8⁺ participam mais do ECL, entretanto ambos os tipos celulares podem participar dos dois efeitos. Contudo, apesar da existência de sobreposição do repertório de células T promotor dos dois efeitos, há partes do repertório que participam exclusivamente de um deles (Bleakley e Riddell, 2004). Além disso, mesmo que os mecanismos efetores dos dois efeitos sejam parecidos, os mecanismos indutores, ou seja, os processos que levam à ativação, expansão e migração das células T, podem ser diferentes. Por sinal, não há uma definição clara de todos os aspectos desses mecanismos indutores, principalmente em relação às citocinas e perfis de diferenciação celular envolvidos. Com relação aos órgãos onde esta indução ocorre, para o ECH há grande riqueza de detalhes e estudos bastante elucidativos, o que não é verdade para o ECL. Uma melhor caracterização dos mecanismos indutores de cada efeito pode, portanto, fornecer novas pistas para a busca de estratégias para separá-los.

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar o papel do IFN- γ na resposta anti-leucemia associada à DECH aguda experimental

Objetivos Específicos

- a) Estabelecer um modelo quantitativo multiparamétrico de DECH aguda experimental (aDECH exp.), com avaliação de mortalidade, escore clínico e escore histopatológico
- b) Estabelecer um modelo quantitativo de resposta ECL
- c) Avaliar a possibilidade de separação dos efeitos ECH e ECL
- d) Avaliar o papel do IFN- γ na aDECH exp. em nosso sistema
- e) Avaliar o papel do IFN- γ na resposta anti-leucemia associada à aDECH exp.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 (B6, H-2^b), B6-IFN- γ KO (animais que possuem o gene para IFN- γ interrompido, em fundo genético de C57BL/6; GKO, H-2^b), BALB/c (BALB/c, H-2^d), F1 (B6 x BALB/c, H-2^{bx^d}) e BDF1 (B6 x DBA/2, H-2^{bx^d}) machos ou fêmeas, de 8 a 12 semanas de idade, fornecidos pelo biotério do Instituto Nacional de Câncer. Os animais foram usados de acordo com as normas institucionais de experimentação animal.

3.2. Meio de cultura

Para todos os experimentos o meio de cultura utilizado foi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma Chemical, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio (3,7g/L), piruvato de sódio (1mM), vitaminas (0,1mM), aminoácidos não essenciais (0,1mM), aminoácidos essenciais (0,1mM), penicilina (10⁵U), estreptomicina (100mg/L) e L-glutamina (2mM) (todos os suplementos obtidos de Gibco, MD, EUA).

3.3. Contagem de células

Todas as contagens de células foram realizadas em câmara de Neubauer, excluindo-se células inviáveis com a utilização de azul de Trypan (Sigma Chemical, MO, EUA).

3.4. Linhagens celulares

A linhagem celular utilizada foi o mastocitoma P815 (Gajewski, Markiewicz *et al.*), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ. A linhagem P815 expressando a Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP) - P815GFP - foi gerada com a utilização do vetor lentiviral EF1 α GFP, e gentilmente cedida pela Ana Carolina Leal e pelo Dr. Martin Bonamino (Divisão de Medicina Experimental - INCA).

3.5. Ensaio para detecção de micoplasma

A linhagem utilizada nos experimentos das **Figuras 9, 10, 14 – 18** (P815GFP) foi testada para a presença de micoplasma por PCR com primers para rRNA 16S (Quadro 1) (Van Kuppeveld, Van Der Logt *et al.*, 1992).

Primer F	GPO-1	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
Primer R	MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTAAAC

Quadro 1. Primers para detecção de micoplasma.

DNA de células P815GFP foi extraído utilizando-se DNAzol (Invitrogen, CA, EUA) com emprego do seguinte protocolo: 10⁶ células foram centrifugadas a 13.500G por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado e ao pellet foram adicionados 300 μ L de DNAzol, com homogeneização, e 150 μ L de etanol absoluto, seguido de agitação e centrifugação a 13.500G por 5 minutos a 4°C. O DNA foi então lavado duas vezes com etanol 70% e por fim ressuspensão em 100 μ L de NaOH 8mM, em aquecimento (60°C) por 30 minutos. O DNA foi quantificado em aparelho NanoDrop® e 200ng foram utilizados na reação.

O PCR foi realizado nas seguintes condições: 95°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com

uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto esperado quando há presença de micoplasma é de 700bp, visualizado em gel de agarose (Bioamerica, FL, EUA) 0,8%, com marcador de peso de 1Kb (Invitrogen, CA, EUA).

3.6. Obtenção de células de Medula Óssea, Baço, Linfonodos, Fígado e Sangue

Células de Medula Óssea (MO) foram obtidas de fêmur e tíbia, cortando-se as extremidades e lavando o interior com meio com 10% de SFB. O baço (Bç), Linfonodos e uma parte do fígado foram macerados em um pedaço de tecido de algodão (trama 44), em placas de cultura (TPP, Suíça) contendo meio com 10% de SFB, para obter uma suspensão de células. Os linfonodos periféricos retirados foram os inguinais, axilares, braquiais, cervicais e poplíteos. Todas as suspensões celulares foram recolhidas em tubos de polipropileno (BD, CA, EUA) e mantidas em gelo até processamento futuro. Foi obtido sangue dos animais pela veia da cauda (20µL) ou pelo plexo retro-orbital (50µL), recolhido com capilar heparinizado (Perfecta, SP, Brasil) e adicionado a 1 volume de Na₂EDTA (Invitrogen, CA, EUA) a 9,6mM em PBS (*Phosphate-Buffered Saline* - NaH₂PO₄ anidro 1,9 mM, Na₂HPO₄ anidro 8,1 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4), para concentração final de EDTA de 4,8mM. Para a retirada de sangue pelo plexo retro-orbital os animais foram anestesiados com Isoflurano (Cristália, SP, Brasil).

3.7. Lise de hemácias

Hemácias de preparações esplênicas foram lisadas utilizando-se solução de ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4). A suspensão de células foi centrifugada a 450G por 5 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado 1mL de ACK para cada 10⁸ células. Após 1 minuto de agitação foram adicionados 10

volumes de PBS e centrifugado novamente a 450G por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em meio com 10% de SFB.

Hemácias de sangue foram lisadas com solução de lise para FACS BD (*BD FACS Lysing Solution*, nº cat. 349202; BD, CA, EUA), da seguinte maneira: a 50µL de sangue em EDTA 4,8mM (volume final) foram adicionados 200µL de solução de lise, agitado por 10 segundos, seguido de centrifugação a 13.500G por 30 segundos, retirada do sobrenadante e ressuspensão das células em PBS.

3.8. Depleção de células T por complemento

A depleção de células T de suspensão de células de MO foi realizada utilizando-se sobrenadantes de hibridomas GK1.5 (rico em anticorpo anti-CD4) e 53-6.7 (rico em anticorpo anti-CD8). A suspensão celular foi centrifugada a 450G por 5 minutos, o sobrenadante descartado, o pellet ressuspensa a 10^8 células/mL em solução contendo 20% de Complemento de Coelho (soro de coelho, colhido no gelo e absorvido em células de baço de camundongo – 10 mL de soro / baço – por 1 hora a 37°C), 40% de sobrenadante de GK1.5 e 40% de sobrenadante de 53-6.7. Esta suspensão foi incubada a 37°C por 30 minutos, e em seguida centrifugada a 450G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio sem SFB contendo 20% de Complemento de Coelho, sendo incubadas novamente a 37°C por 30 minutos. Por fim a suspensão celular foi centrifugada a 450G por 5 minutos e as células ressuspensas em meio com 10% de SFB. A eficiência da depleção foi verificada por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD3 (eBioscience, CA, EUA).

3.9. Ativação de linfócitos T *in vitro*

Para a fenotipagem mostrada na **Figura suplementar 2 B**, linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos foram ativados *in vitro* com 2,5µg/mL de Concanavalina A (ConA, lectina de *Canavalia ensiformis*; Sigma-Aldrich, MO, EUA) durante 36h, a 37°C e 5% de CO₂, em placas para cultura celular de 6 poços (TPP, Suíça) e à concentração de 2x10⁶ células/mL. Em seguida foram retirados da placa com pipeta pasteur, centrifugados a 450G por 5 minutos e ressuspensos em meio com 10% de SFB.

3.10. Anticorpos e citometria

3.10.1. Detecção de moléculas de superfície

Os anticorpos e reagentes utilizados foram: anti-B220 (clone RA3-6B2) biotina e anti-H-2D^b (clone KH95) biotina (Pharmingen/BD, CA, EUA); anti-CD3 (clone 145-2C11) FITC e PECy5, anti-CD4 (clone GK1.5) PE e PECy5, anti-CD8 (clone 53-6.7) PECy5 e Streptavidina-APC (eBioscience, CA, EUA).

As células foram centrifugadas a 13.500G por 30 segundos, o sobrenadante descartado, e incubadas com PBS contendo 2% de soro normal de camundongo (produzido no nosso laboratório) por 5 minutos. Em seguida foram incubadas com os anticorpos por 15 minutos, centrifugadas a 13.500G por 30 segundos e ressuspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD, CA, EUA).

3.10.2. Detecção de citocinas intracelulares

Os anticorpos e reagentes utilizados foram: anti-IFN-γ (clone XMG1.2, Pharmingen/BD, CA, EUA) FITC e PE; anti-IL17A (clone eBio17B7, eBioscience, CA, EUA) FITC e PE; Saponina e Paraformaldeído (Sigma, MO, EUA).

Para detecção de citocinas intracelulares as células foram previamente incubadas por 4 horas com 20nM de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, Calbiochem, CA, EUA), 1µM de Ionomicina (Calbiochem, CA, EUA) e 3µM de Monensina (Sigma, MO, EUA), em 1mL de meio com 10% de SFB em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça) a 37°C e 5% de CO₂. As células foram então recolhidas da placa, centrifugadas a 450G por 5 minutos e marcadas para moléculas de superfície como descrito no item **3.10.1**. Em seguida foram fixadas com Paraformaldeído 4% por 5 minutos a temperatura ambiente, lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpos anti-citocinas diluídos em PBS contendo 0,3% de Saponina e 2% de soro normal de camundongo. Após lavagem com PBS contendo 0,3% de Saponina e em seguida somente com PBS, foram ressuspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo.

3.11. Transplante de Medula Óssea

3.11.1. Preparação dos grupos

Os animais utilizados como receptores foram preferencialmente fêmeas, com idade variando de 10 a 12 semanas, já os machos utilizados tinham entre 8 e 10 semanas. Os animais doadores foram preferencialmente machos de 8 a 12 semanas. Os animais receptores foram pesados e marcados na orelha um dia antes do transplante, sendo divididos em grupos homogêneos com relação ao peso. Os animais foram mantidos em micro-isolador e manipulados em fluxo laminar a partir da irradiação, recebendo água ácida (pH 2,5-3) antes e após o transplante, ou apenas após, quando indicado. Todos os transplantes para avaliação de DECH contiveram pelo menos um grupo controle negativo para a doença (indicado como Singeneico ou MO) e um grupo controle positivo (indicado como semi-Alogeneico ou Alogeneico).

3.11.2. Irradiação

A dose de irradiação letal foi previamente determinada para cada linhagem, e foi considerada apropriada (dose ótima) a dose que gerou 100% de reconstituição hematopoiética com células do doador (quimerismo total) trinta dias após o transplante em animais receptores (Quadro 2).

Linhagem	Dose de radiação (cGy)
BALB/c	850
F1	950
B6	1100
BDF1	1100

Quadro 2. Dose de irradiação por linhagem.

A irradiação foi realizada em aparelho TH780C (Theratronics, Canada), que utiliza fonte irradiadora de cobalto 60 (^{60}Co), 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.

3.11.3. Transplante – Indução de DECH

Vinte e quatro horas após a irradiação os animais receberam o transplante (por via endovenosa, através da veia da cauda), contendo sempre células de MO, depletadas de células T quando indicado, juntamente com células esplênicas (sem hemácias) corrigidas para a quantidade desejada de células T (CD3^+); as quantidades de células de MO e CD3^+ , bem como as linhagens de onde foram obtidas, estão indicadas para cada experimento nas legendas das figuras na seção de **Resultados**. Os grupos de animais receptores de células P815 ou P815GFP receberam as doses indicadas juntamente com o transplante.

Nos transplantes alogeneicos para avaliação de DECH (B6→BALB/c e BALB/c→B6) o transplante realizado apenas com MO alogeneica foi usado como controle negativo para a doença. Nos transplantes semi-alogeneicos (Parental→F1: B6→F1 e B6→BDF1) foi utilizado transplante com MO semi-alogeneica e células esplênicas singeneicas como controle negativo para a doença.

3.12. Avaliação da DECH aguda experimental

3.12.1. Mortalidade

Os animais transplantados foram acompanhados diariamente para avaliação da mortalidade relacionada ao transplante. Animais moribundos (com escore clínico ≥ 8) foram sacrificados e contabilizados como mortos no mesmo dia.

3.12.2. Sistema de Escore Clínico

O sistema de escore clínico foi adaptado da literatura (Brok, Heidt *et al.*; Cooke, Kobzik *et al.*). Esse sistema consiste na avaliação de cinco parâmetros (Peso, Pele, Diarréia, Postura e Atividade), com classificação das alterações encontradas em três níveis, atribuindo-se o valor 0 para ausência de alterações, 1 para alterações moderadas e 2 para grandes alterações (Quadro 3). Os valores atribuídos a cada um dos cinco parâmetros foram somados para obtenção do escore clínico total.

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

Pele

- 0 – Normal
- 1 – Alterações no pêlo (irregularidades, eriçamento)
- 2 – Alopecia, eritema e/ou lesões na pele

Diarréia

- 0 – Ausente
- 1 – Moderada (fezes parcialmente amolecidas, mas com consistência)
- 2 – Severa (fezes amolecidas e sem consistência ou líquidas)

Postura

- 0 – Normal
- 1 – Parcialmente curvada ou curvada apenas em repouso
- 2 – Curvada

Atividade

- 0 – Normal
 - 1 – Redução na movimentação
 - 2 – Movimento apenas quando estimulado
-

Quadro 3. Sistema de Escore Clínico.**3.12.3. Sistema de Escore Histopatológico**

O sistema de Escore Histopatológico foi também adaptado da literatura (Ferrara, Guillen *et al.*; Hill, Cooke *et al.*; Van Den Brink, Moore *et al.*; Welniak, Blazar *et al.*), com a colaboração do Dr. João Paulo Monteiro (Divisão de Medicina Experimental, CPQ, INCA). Foram avaliados a pele, o cólon ascendente e o fígado. Amostras destes órgãos foram retiradas nos tempos indicados 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 (Quadros 4, 5 e 6). Os valores atribuídos a cada um dos quatro parâmetros foram somados para cálculo do escore histopatológico do órgão avaliado. Os cortes foram avaliados pelo Dr. João Paulo.

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 + 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 e apoptose da camada basal (disceratose)

Ulceração

- 0 – Ausente (queratina normal)
 - 1 – Redução da queratina
 - 2 – Ulcerações
-

Quadro 4. Sistema de Escore Histopatológico para Pele.

Histopatologia | Cólon
Infiltração da Lâmina própria

- 0 – Ausente ou rara
- 1 – Presente e dispersa
- 2 – Presente formando aglomerados (nódulos, folículos)

Infiltração de Camadas Profundas

- 0 – Ausente
- 1 – Até submucosa
- 2 – Além da submucosa

Alterações Estruturais

- 0 – Criptas normais
- 1 – Elongamento de criptas (epitélio hiperplásico) com apoptose e/ou figuras de mitose
- 2 – Destruição de criptas

Extensão do dano

- 0 – Ausente
 - 1 – Limitado a 25% da área corte
 - 2 – Superior a 25% da área corte
-

Quadro 5. Sistema de Escore Histopatológico para Cólon.

Histopatologia | Fígado
Alterações globais do parênquima

- 0 – Ausentes
- 1 – Tumefação ou esteatose focais (< 25% do corte)
- 2 – Tumefação ou esteatose globais (> 25% do corte)

Alterações do espaço porta

- 0 – Normal
- 1 – Expansão do espaço porta por infiltração sem destruição das estruturas
- 2 – Expansão + infiltração/lesão de ductos biliares e/ou vasos

Infiltração inflamatória

- 0 – Ausente ou rara (limitada a células dispersas próximas aos espaços vasculares)
- 1 – Presente e dispersa no parênquima
- 2 – Presente formando aglomerados

Sofrimento do parênquima

- 0 – Ausente
 - 1 – Aumento do número de células apoptóticas e/ou figuras de mitose sem haver necrose do parênquima
 - 2 – Presença de focos de necrose (áreas de coagulação e/ou microabcessos)
-

Quadro 6. Sistema de Escore Histopatológico para Fígado.

3.13. Detecção de células P815GFP

Células P815GFP foram detectadas na Medula Óssea, Baço, Linfonodos, Fígado e Sangue por citometria de fluxo. Para a detecção no sangue as amostras foram primeiro depletadas de hemácias com solução de lise BD FACS, como descrito no item 3.7. As demais amostras foram analisadas diretamente a partir das suspensões celulares obtidas como descrito no item 3.6. Pelo menos 30.000 eventos foram coletados das amostras de sangue e pelo menos 10.000 das demais amostras. A faixa de detecção de células GFP⁺ é então da ordem de 4 logaritmos, com um limite inferior igual a 0,01% (10^{-2} %). O percentual de células GFP⁺ foi transformado para escala logarítmica em todas as amostras, e as comparações feitas a partir daí. Às amostras nas quais não foram detectadas células GFP⁺ foi atribuído valor um logaritmo abaixo do limite de detecção ($0,001 = 10^{-3}$), para permitir a transformação para a escala log. A transformação logarítmica é necessária neste caso pois os dados apresentam distribuição exponencial, algo esperado visto que o crescimento das células P815GFP é exponencial. Essa transformação facilita as comparações, pois garante normalidade de distribuição para as médias amostrais e a homogeneidade de variâncias entre grupos, dois parâmetros indispensáveis para a utilização dos testes paramétricos empregados (De Marco Junior e Paglia, 2003).

3.14. Análises estatísticas

Para a confecção dos gráficos e realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). Foram utilizadas análises de variância de um ou dois fatores, com pós-teste de Bonferroni, ou teste t de Student. As

médias foram consideradas diferentes quando a probabilidade de serem iguais foi menor que 5% ($p < 0,05$), de acordo com os testes indicados.

4.RESULTADOS

4.1. Modelo de DECH aguda experimental: aspectos quantitativos na avaliação da doença

Um sistema de avaliação de parâmetros clínicos foi adaptado da literatura (Brok, Heidt *et al.*, 1993; Cooke, Kobzik *et al.*, 1996) para que uma avaliação mais ampla e precisa da DECH fosse realizada em nossos modelos experimentais. O uso desse sistema foi então validado em nosso laboratório com a utilização dos modelos experimentais de DECH mais utilizados na literatura, dois deles alogeneicos (B6→BALB/c e BALB/c→B6) e dois semi-alogeneicos (Parental→F1: B6→F1 e B6→BDF1) (**Figuras 4 a 7**). Dois grupos experimentais foram utilizados por transplante, um controle negativo para a doença (Singeneico ou MO) e um controle positivo para a doença (semi-Alogeneico ou Alogeneico). A mortalidade associada à DECH nesses modelos é mostrada na **Figura 4**. Nos controles negativos, animais receptores F1 (B6 x BALB/c – daqui em diante designado apenas como F1), BDF1 (B6 x DBA/2), BALB/c ou B6 foram irradiados e transplantados apenas com MO alogeneica (B6→BALB/c e BALB/c→B6 – grupos indicados como MO) ou com MO e células T singeneicas [B6→F1 e B6→BDF1 – grupos indicados como Singeneico (Sin)]. Nos controles positivos, receptores irradiados foram transplantados com MO e células T semi-Alogeneicas (indicados como semi-Alo) ou com MO e células T Alogeneicas (indicados como Alo). Os animais foram avaliados segundo os parâmetros indicados no item **3.12.2** (Materiais e Métodos), sendo pesados e cuidadosamente avaliados para modificações

associadas à DECH na pele, alterações na consistência das fezes e alterações de postura e atividade (**Figura 5**). Cada animal recebeu um valor para cada parâmetro, sendo 0 para ausência de alterações, 1 para alterações moderadas e 2 para grandes alterações, e os valores dos cinco parâmetros foram somados para obtenção do escore total de DECH, que representa a severidade da doença. A **Figura 5** mostra os valores de escore total e dos parâmetros separados para os transplantes cuja mortalidade é mostrada na **Figura 4**.

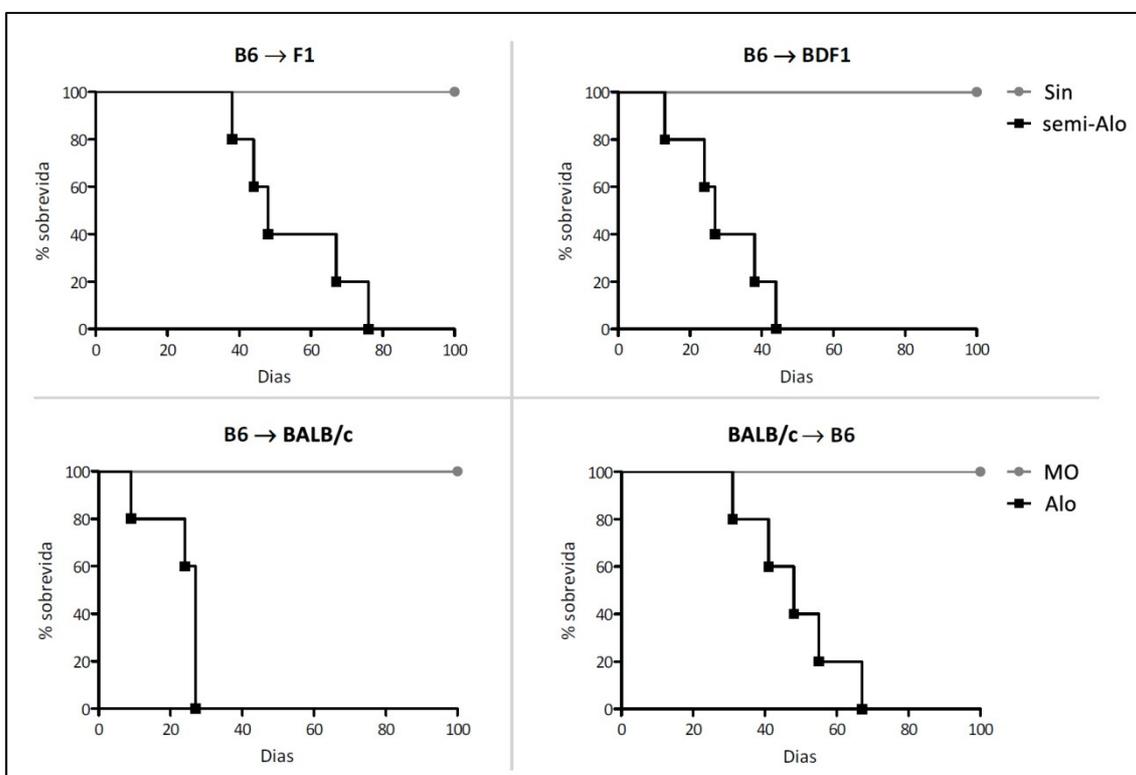


Figura 4. Mortalidade nos modelos de aDECH experimental disponíveis no laboratório. Receptores foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6 (receptores F1, BDF1 e BALB/c) ou de BALB/c (receptores B6). Grupos indicados como MO: receptores BALB/c ou B6 recebendo apenas MO. Grupos indicados como Singeneico (Sin): receptores F1 e BDF1 recebendo MO e 10^7 células $CD3^+$ de baço total de F1 e BDF1, respectivamente. Grupos indicados como alogeneicos (Alo): receptores transplantados com MO e 5×10^6 células $CD3^+$ de baço total de B6 (receptores BALB/c) ou MO e 10^7 células $CD3^+$ de baço total de BALB/c (receptores B6). Grupos indicados como semi-alogeneicos (semi-Alo): receptores transplantados com MO e 10^7 células $CD3^+$ de baço total de B6 (receptores F1 e BDF1). Receptores fêmeas e doadores machos. Cinco animais por grupo. Indicação superior: Doador → Receptor.

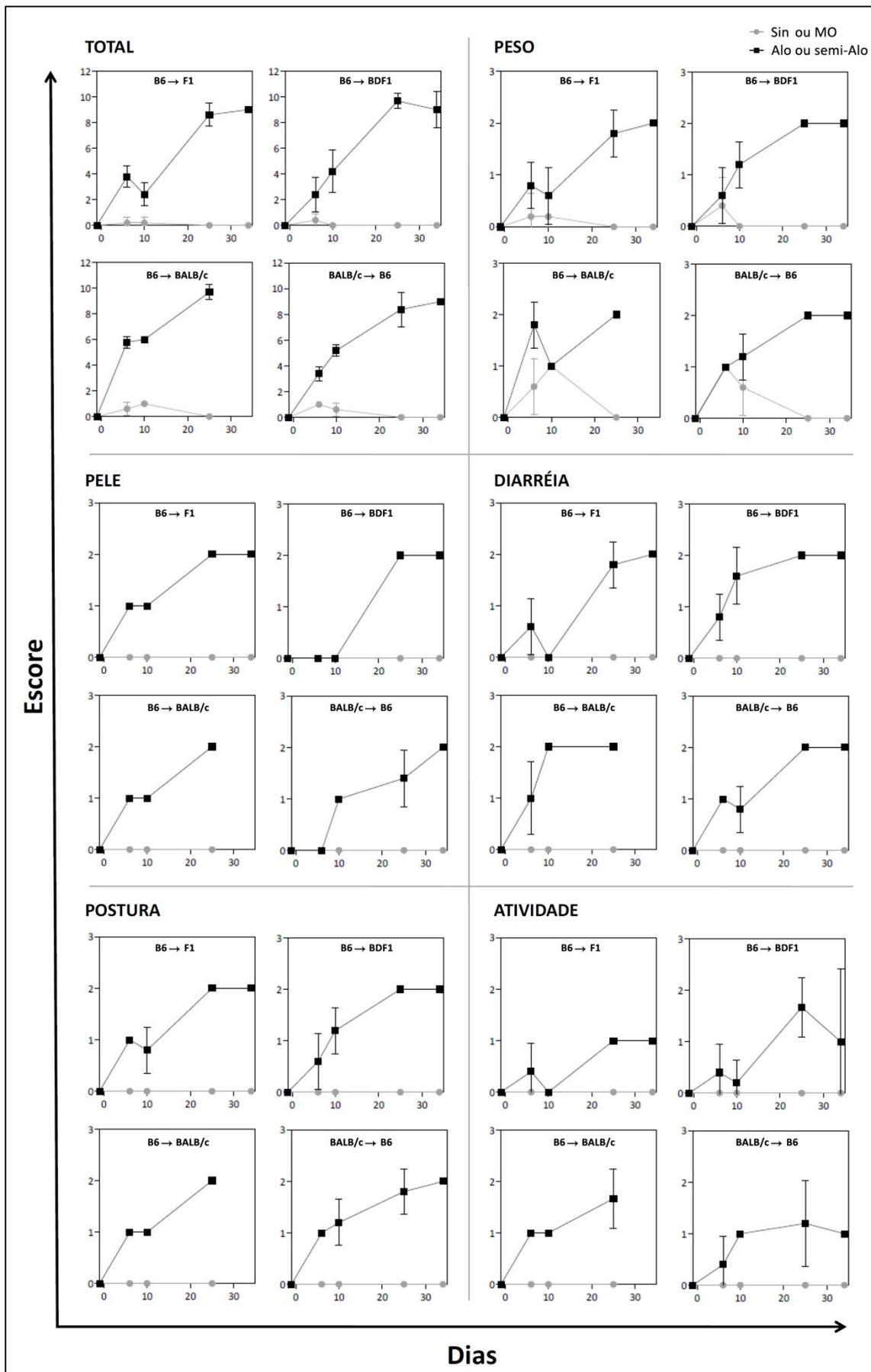


Figura 5. Escore clínico nos modelos de aDECH experimental disponíveis no laboratório. Os valores de Escore clínico dos transplantes da **Figura 4** são mostrados, somados (Escore TOTAL), ou separados por categoria (PESO, PELE, DIARRÉIA, POSTURA e ATIVIDADE).

A **Figura 6** mostra como foi feita a avaliação da pele dos animais. As alterações moderadas são principalmente irregularidades e eriçamento do pêlo (**Figura 6 B**). Essas alterações podem evoluir para alopecia, eritema e às vezes formações de feridas na pele (**Figura 6 C**).

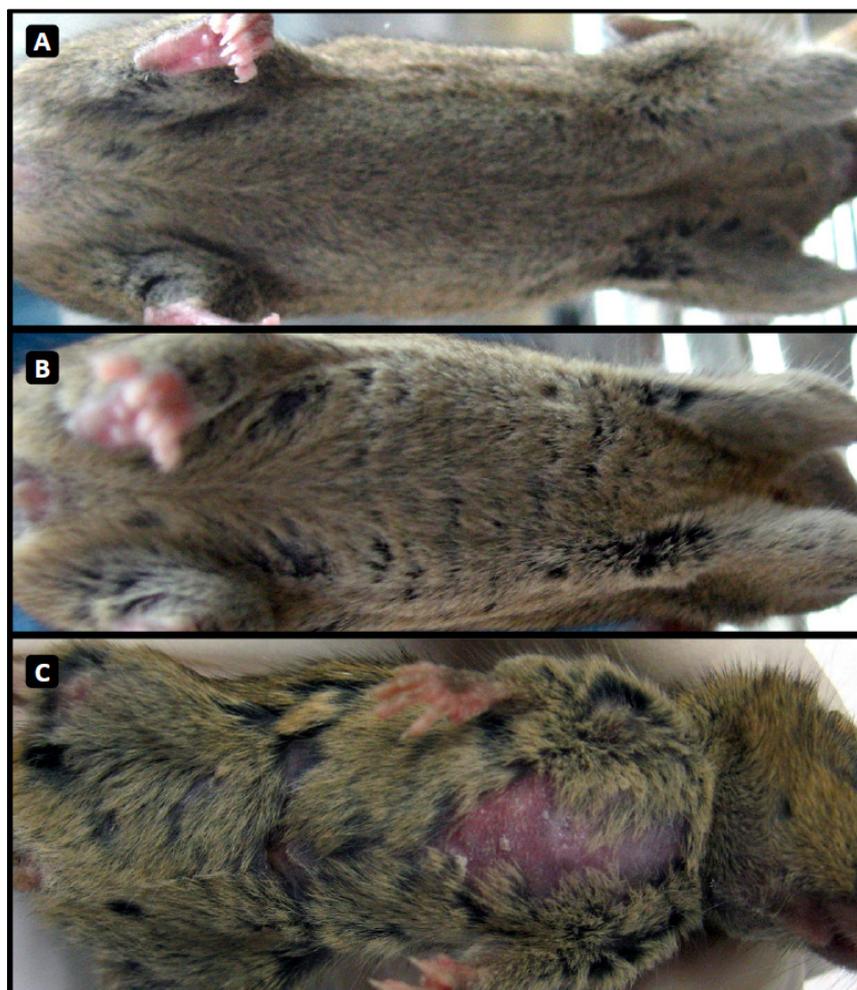


Figura 6. Escore de pele. Animais F1 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 células de MO total de B6 e 10^7 células $CD3^+$ de baço total de F1 ou B6. Receptores fêmeas e doadores machos (**Figura 4**, B6→F1). **A**) Controle singeneico: Animal receptor de células T de F1 10 dias após o transplante. **B** e **C**) Transplante semi-alogeneico: Animal receptor de células T de B6 dez (**B**) e 25 dias (**C**) após o transplante. Escore de pele: **A** = 0; **B** = 1; **C** = 2.

Na **Figura 7** está ilustrada a avaliação de postura dos animais. A alteração moderada da postura pode apresentar-se por uma postura curvada apenas em repouso ou por uma postura parcialmente curvada (**Figura 7 D**). Já a alteração considerada severa é caracterizada por uma grande curvatura na postura, observada mesmo em movimento (**Figura 7 C**).

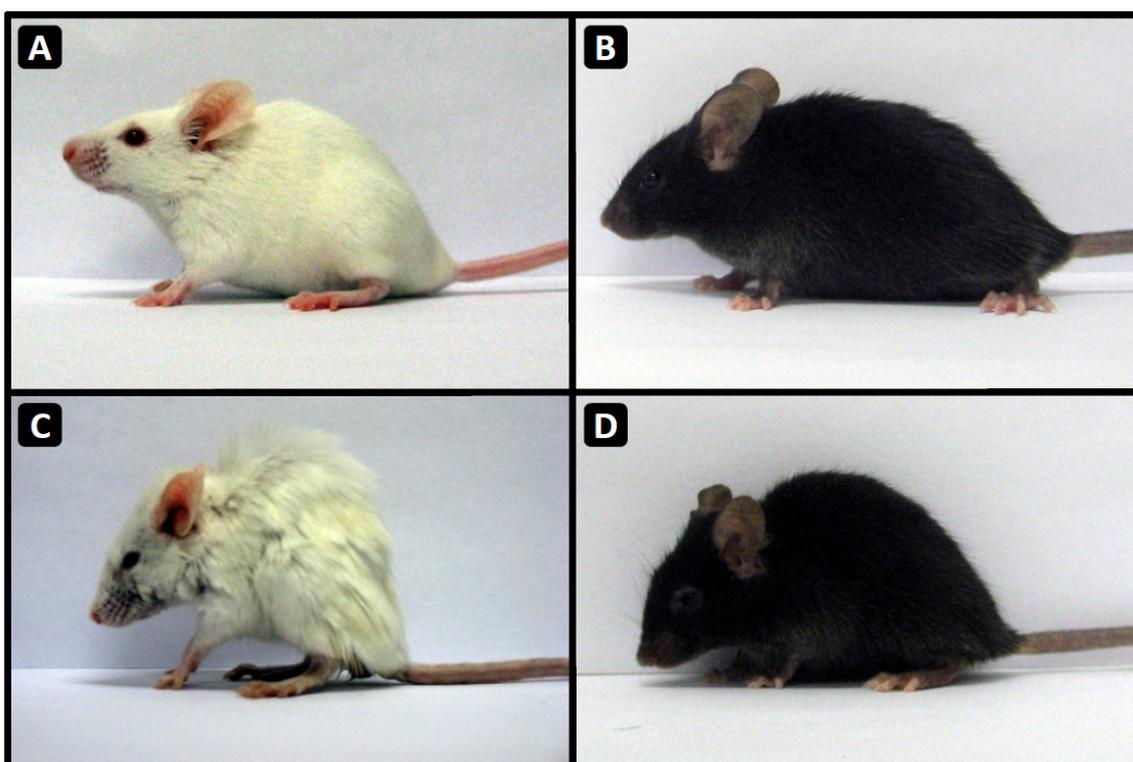


Figura 7. Escore de postura. **A e C)** Animais BALB/c foram irradiados e transplantados com 5×10^6 células de MO total de B6 ou com MO e 5×10^6 células $CD3^+$ de baço total de B6 (**Figura 4**, B6→BALB/c). **B e D)** Animais B6 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 células de MO total de BALB/c ou com MO e 10^7 células $CD3^+$ de baço total de BALB/c (**Figura 4**, BALB/c→B6). Receptores fêmeas e doadores machos. **A e B)** Receptores de MO 25 dias após o transplante. **C e D)** Receptores de MO e células T alogeneicas 25 dias após o transplante. Escore de postura: **A e B = 0; C = 2; D = 1.**

Os animais foram também avaliados quanto à presença de diarreia durante a pesagem. As alterações ocorrem principalmente na quantidade de líquido e na consistência das fezes. Fezes parcialmente amolecidas, mas com consistência, são consideradas diarreia moderada. Fezes amolecidas e sem consistência (pastosas) ou líquidas são consideradas diarreia severa.

Após a pesagem os animais foram avaliados quanto à atividade, sendo a mesma considerada normal quando semelhante à dos animais controle negativo para a doença ou de animais normais não transplantados, moderadamente alterada quando é mais lenta ou quando não há atividade contínua (ocorrem pausas de alguns minutos na movimentação), e severamente alterada quando os animais praticamente não se movimentam ou só o fazem quando tocados.

O parâmetro peso é avaliado em relação ao peso dos animais antes do transplante. Perda de peso de até 10% do peso inicial é considerada normal, perda de 11 a 25% considerada moderada e de mais de 25% considerada severa.

Com o estabelecimento dos parâmetros descritos acima para avaliar a gravidade da aDECH experimental, fomos capazes de obter uma medida de morbidade, que é mais informativa que apenas a determinação de mortalidade.

4.2. Modelo quantitativo de resposta ECL

Para se avaliar a eficácia de um determinado tratamento contra a DECH faz-se necessário saber se este tratamento influencia o efeito ECL associado ao transplante, visto que esse efeito é essencial para o sucesso do TCTH no tratamento de malignidades (Appelbaum, 2001). Apesar disso, na literatura há poucos modelos capazes de diferenciar claramente os efeitos ECH e ECL (Zeiser, Nguyen *et al.*, 2006; Duran-Struuck, Tawara *et al.*, 2007).

Com o intuito de estabelecer um modelo de transplante onde pudessem ser avaliados, ao mesmo tempo, os efeitos ECL e ECH, a fim de discriminá-los e quantificá-los, foi utilizado inicialmente um modelo já estabelecido na literatura, que utiliza o mastocitoma P815 como leucemia e a combinação B6→BDF1 como par Doador→Receptor (Hill, Teshima *et al.*, 1999; Krijanovski, Hill *et al.*, 1999; Pan, Teshima *et al.*, 1999; Teshima, Hill *et al.*, 1999; Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Cooke, Gerbitz *et al.*, 2001; Clouthier, Cooke *et al.*, 2003; Imado, Iwasaki *et al.*, 2004). Para testar a letalidade dessas células em nosso sistema animais BDF1 foram irradiados e transplantados com MO singeneica, contendo ou não 10^5 ou 10^7 células P815 (**Figura 8 A**). Os animais receptores morreram dentro de uma faixa de 35 dias, apresentando uma mortalidade mais rápida quando receberam uma dose maior de células leucêmicas (**Figura 8 A**). Como já descrito para esse modelo (De La Selle, Riche *et al.*, 1999; Hill, Teshima *et al.*, 1999; Krijanovski, Hill *et al.*, 1999; Pan, Teshima *et al.*, 1999; Teshima, Hill *et al.*, 1999; Tsukada, Kobata *et al.*, 1999; Cooke, Gerbitz *et al.*, 2001; Wang, Shaw *et al.*, 2002; Clouthier, Cooke *et al.*, 2003; Imado, Iwasaki *et al.*, 2004), vários animais receptores de células tumorais, mas não todos, desenvolveram paralisia

de membros e apresentaram nódulos tumorais no fígado na necropsia. Porém, alguns apresentavam tumores em linfonodos (mesentéricos, cervicais, axilares, inguinais, poplíteos ou para-aórticos, nunca com um padrão claro), outros apresentavam tumores na região da coluna vertebral, até mesmo sem paralisia antes da morte, outros não apresentavam tumores visíveis nem paralisia. Esta grande variação

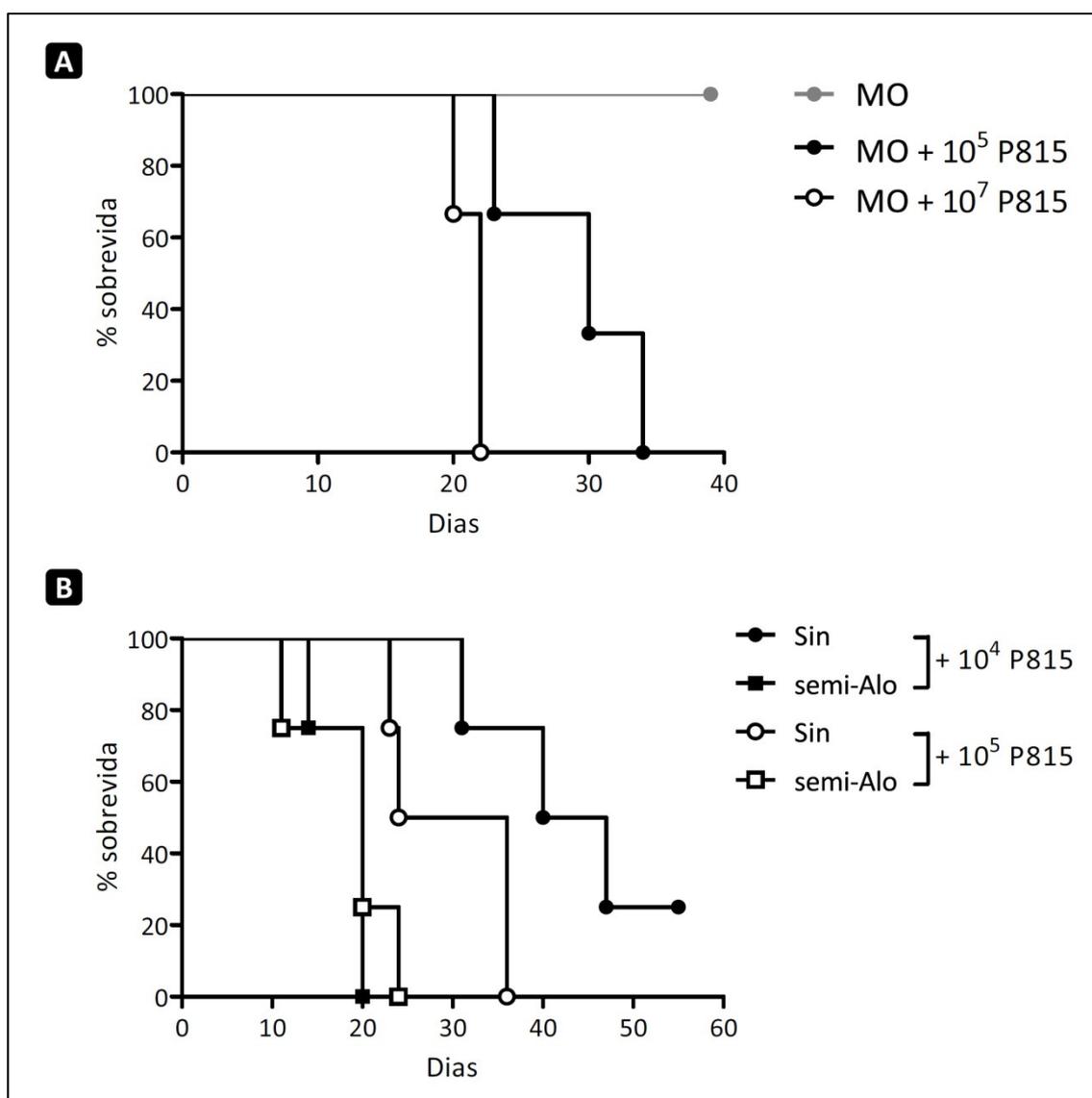


Figura 8. A) Receptores BDF1 fêmeas foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de BDF1 ou com MO e 10^5 ou 10^7 células P815. Três animais por grupo. **B)** Receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6, 10^4 ou 10^5 células P815, e 5×10^6 células CD3⁺ de baço total de BDF1 (Sin) ou B6 (semi-Alo). Os receptores foram tratados com água ácida após o transplante durante 14 dias. Receptores e doadores machos. Quatro animais por grupo.

impossibilitaria uma avaliação precisa do número de animais mortos por causa relacionada ao tumor, utilizando-se apenas necropsia dos animais como forma de avaliação.

Para verificar se os efeitos ECL e ECH poderiam ser diferenciados pela mortalidade foi realizado então um transplante completo, com grupos singeneico e semi-alogeneico recebendo, em duas doses, células P815. Animais BDF1 foram irradiados e transplantados com MO semi-alogeneica, 10^4 ou 10^5 células P815, e células T singeneicas ou semi-alogeneicas (**Figura 8 B**). Visto que, nos animais que receberam células T singeneicas e células leucêmicas, a dose de 10^4 células P815 já não causa 100% de mortalidade, a dose de 10^5 células foi escolhida como a dose mínima a ser utilizada. Pode-se observar que a curva que representa a mortalidade dos animais que receberam células T semi-alogeneicas nas duas doses de células leucêmicas é muito próxima da curva de mortalidade dos animais que receberam células T singeneicas e 10^5 células leucêmicas (a dose P815 a ser utilizada). Seria difícil, portanto, diferenciar essas curvas em experimentos futuros visto que pequenas variações poderiam torná-las indistinguíveis. Além disso, as mesmas variações quanto à localização e presença de nódulos tumorais e quanto à paralisia de membros observadas no transplante da **Figura 8 A** foi observada nesse transplante, o que levou à procura de um novo método para identificação das células leucêmicas e à adaptação do modelo de P815.

Células P815 expressando GFP de maneira estável foram utilizadas, permitindo a identificação dessas células por citometria de fluxo. Essas células foram devidamente testadas para a presença de micoplasma, e usadas apenas quando negativas por teste de PCR (Figura suplementar 1) (Van Kuppeveld, Van Der Logt *et al.*, 1992). Para testar a letalidade dessas células e verificar se havia diferenças nos padrões de certa forma

relacionados à morte por P815, receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com MO semi-alogeneica e 10^6 células P815GFP (**Figura 9**). Houve morte de 100% dos animais receptores (**Figura 9 A**), alguns apresentaram paralisia de membros, alguns

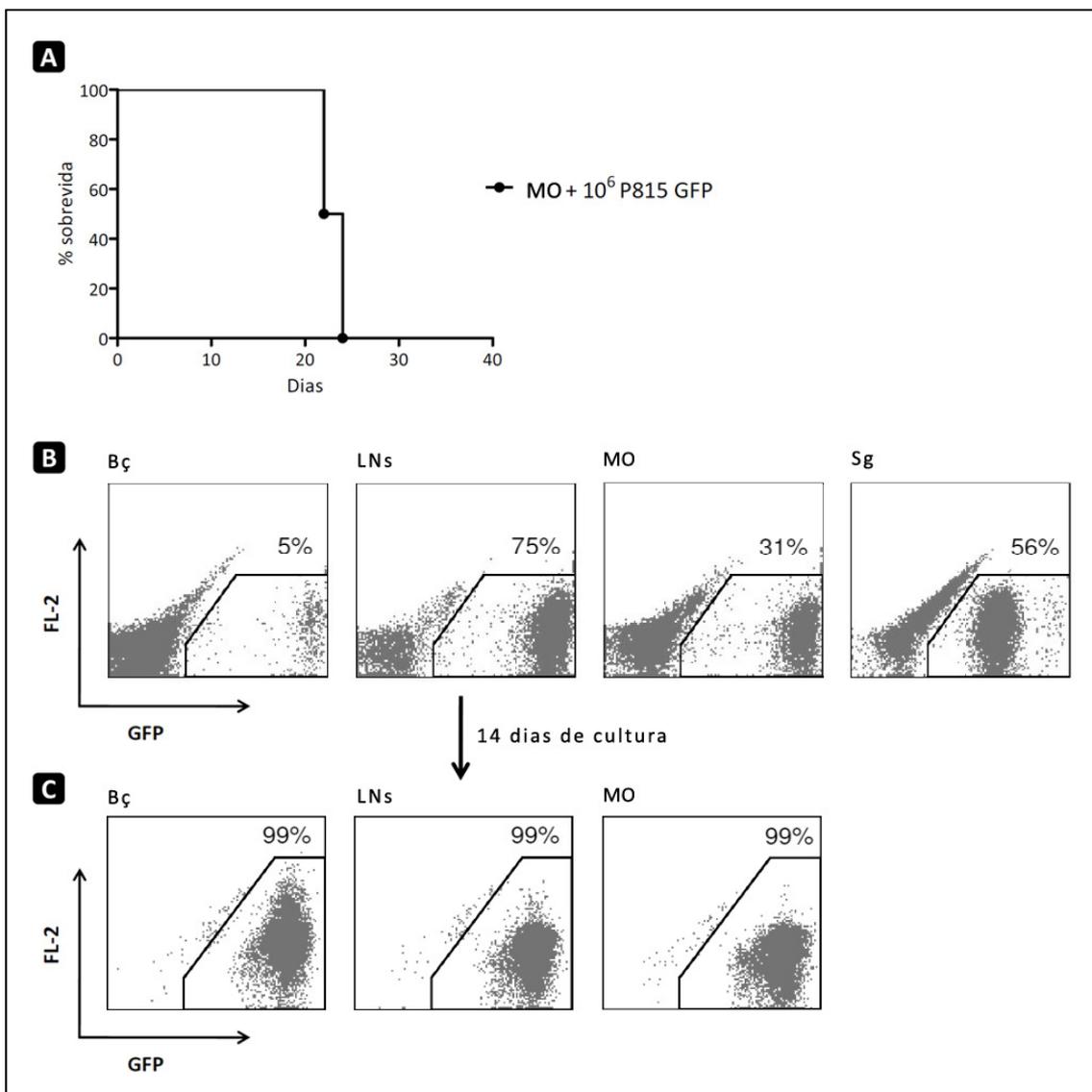


Figura 9. Receptores BDF1 machos foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6 e 10^6 células P815GFP. Os receptores foram tratados com água ácida após o transplante durante 14 dias. Quatro animais transplantados. **A)** Mortalidade. **B)** Animais moribundos foram sacrificados e células obtidas do Baço (Bç), Linfonodos (LNs – agrupamento de mesentéricos, inguinais, axilares, braquiais, poplíteos, para-aórticos e cervicais), Medula Óssea (MO) ou Sangue (Sg) foram avaliadas por citometria de fluxo. **C)** Células de Bç, LNs e MO foram colocadas em cultura e 14 dias depois avaliadas novamente por citometria. Gráficos de um animal representativo são mostrados em **B** e **C**.

nódulos tumorais no fígado, alguns em linfonodos, em padrões dispersos, semelhante ao que ocorre nos animais receptores de células P815 selvagem (Sv). Os animais foram estritamente acompanhados e os moribundos foram sacrificados, com a retirada de baço, linfonodos, medula óssea e sangue para avaliação por citometria de fluxo, sendo encontradas células GFP⁺ em todos esses locais e em todos os animais avaliados (Gráficos de um animal representativo de quatro são mostrados na **Figura 9 B**).

As suspensões celulares obtidas desses locais (exceto de sangue, devido à fixação no processo de lise de hemácias utilizado – solução de lise BD FACS) foram então colocadas em cultura durante duas semanas, para garantir que não houve, *in vivo*, perda de células GFP⁺, seja por possível crescimento de células negativas ou por perda do vetor viral contendo o gene para GFP (**Figura 9 C** – Gráficos de um animal representativo, o mesmo que em **B**).

Com as células leucêmicas podendo agora ser identificadas, foi realizado um transplante completo. Receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com MO semi-alogeneica, 10⁵ células P815GFP e células T singeneicas ou semi-alogeneicas (**Figura 10**). O percentual de células GFP⁺ no sangue dos receptores foi acompanhado durante todo o transplante (**Figura 10 A**). Pode-se observar um aumento contínuo no número de células leucêmicas no sangue dos receptores de células T singeneicas, e a ausência de células leucêmicas nos receptores de células T semi-alogeneicas, o que evidencia a ocorrência de efeito ECL neste último grupo. Animais do grupo singeneico moribundos foram sacrificados e o percentual de células GFP⁺ no baço, linfonodos e medula óssea foi avaliado por citometria (**Figura 10 B**), mostrando a presença de células leucêmicas também nesses locais. Ao mesmo tempo, a DECH foi avaliada neste transplante utilizando-se o sistema de escore clínico (**Figura 10 C**), que mostrou a

presença de efeito ECH no grupo que recebeu células T semi-alogeneicas. Em conjunto, esses resultados mostram que esses dois sistemas são capazes de identificar os efeitos ECH e ECL de maneira específica, podendo ser então utilizados para diferenciá-los e quantificá-los.

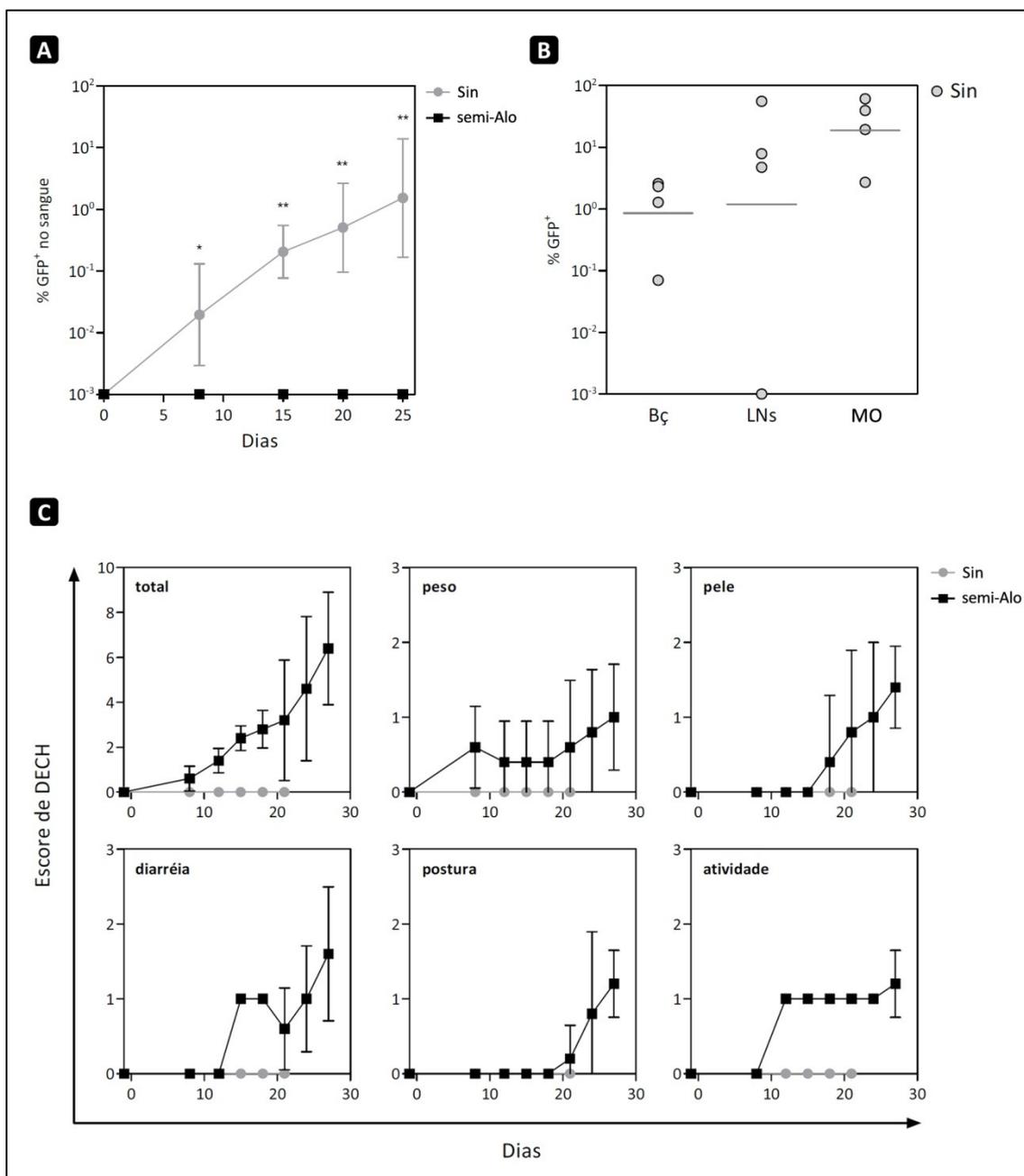


Figura 10. Receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6, 10^5 células P815GFP, e 5×10^6 células CD3⁺ de baço total de BDF1 (Sin) ou B6 (semi-Alo). Os receptores foram tratados com água ácida após o transplante durante 14 dias. Receptores e doadores machos. Cinco animais por grupo. **A)** Percentual de células GFP⁺ no sangue dos animais dos respectivos grupos durante o transplante. **B)** Percentual de células GFP⁺ no Baço (Bç), Linfonodos (LNs – agrupamento de mesentéricos, inguinais, axilares, braquiais, poplíteos, para-aórticos e cervicais) e Medula Óssea (MO) de animais moribundos sacrificados do grupo Singeneico. O traço representa a média. **C)** Escore de DECH.

4.3. Papel do IFN- γ na aDECH exp.

A possibilidade de diferenciar os efeitos ECH e ECL abre portas para perguntas relacionadas não apenas a tratamentos inibitórios da DECH como também para estudos que visem o entendimento dos mecanismos envolvidos com esses efeitos. Sendo assim, uma das perguntas que surgiram inicialmente foi qual seria a relação do IFN- γ com os mecanismos envolvidos com os efeitos ECH e ECL. Esta não é uma pergunta nova na literatura, uma vez que o papel do IFN- γ na DECH é alvo de vários estudos e sua relação com o efeito ECL também já foi abordada, contudo os dados apresentados até hoje na literatura não mostram um mecanismo claro (Brok, Heidt *et al.*, 1993; Brok, Vossen *et al.*, 1997; Murphy, Welniak *et al.*, 1998; Yang, Dey *et al.*, 1998; Welniak, Blazar *et al.*, 2000; Stuber, Schlenger *et al.*, 2001; Ellison, Bradley *et al.*, 2002; Yang, Qi *et al.*, 2002; Asavaroengchai, Wang *et al.*, 2007; Mauermann, Burian *et al.*, 2008; Wang, Asavaroengchai *et al.*, 2009).

Com a utilização de camundongos geneticamente modificados, que possuem o gene que codifica IFN- γ interrompido (IFN- γ *knockout* – GKO; fundo genético de C57BL/6 – B6-GKO), o primeiro passo consistiu em verificar se os dados da literatura utilizando esses animais como doadores ou receptores em modelos de DECH (Murphy, Welniak *et al.*, 1998; Yang, Dey *et al.*, 1998; Yang, Qi *et al.*, 2002) eram reproduzidos em nosso sistema. Foi realizada a fenotipagem dos animais GKO, não sendo verificadas grandes alterações na frequência de linfócitos no baço e confirmando-se a ausência de produção de IFN- γ por linfócitos ativados desses animais (Figura suplementar 2). Em seguida foi realizado o transplante, onde receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com MO de B6 e células T singeneicas (Células de BDF1), semi-

alogeneicas Selvagens (Sv - células de B6) ou semi-alogeneicas GKO (Células de B6-GKO). Como apresentado na literatura (Murphy, Welniak *et al.*, 1998; Yang, Dey *et al.*, 1998; Yang, Qi *et al.*, 2002), as células T de animais GKO induzem uma DECH mais severa, com uma mortalidade e um aumento de escore clínico mais rápidos (**Figura 11**).

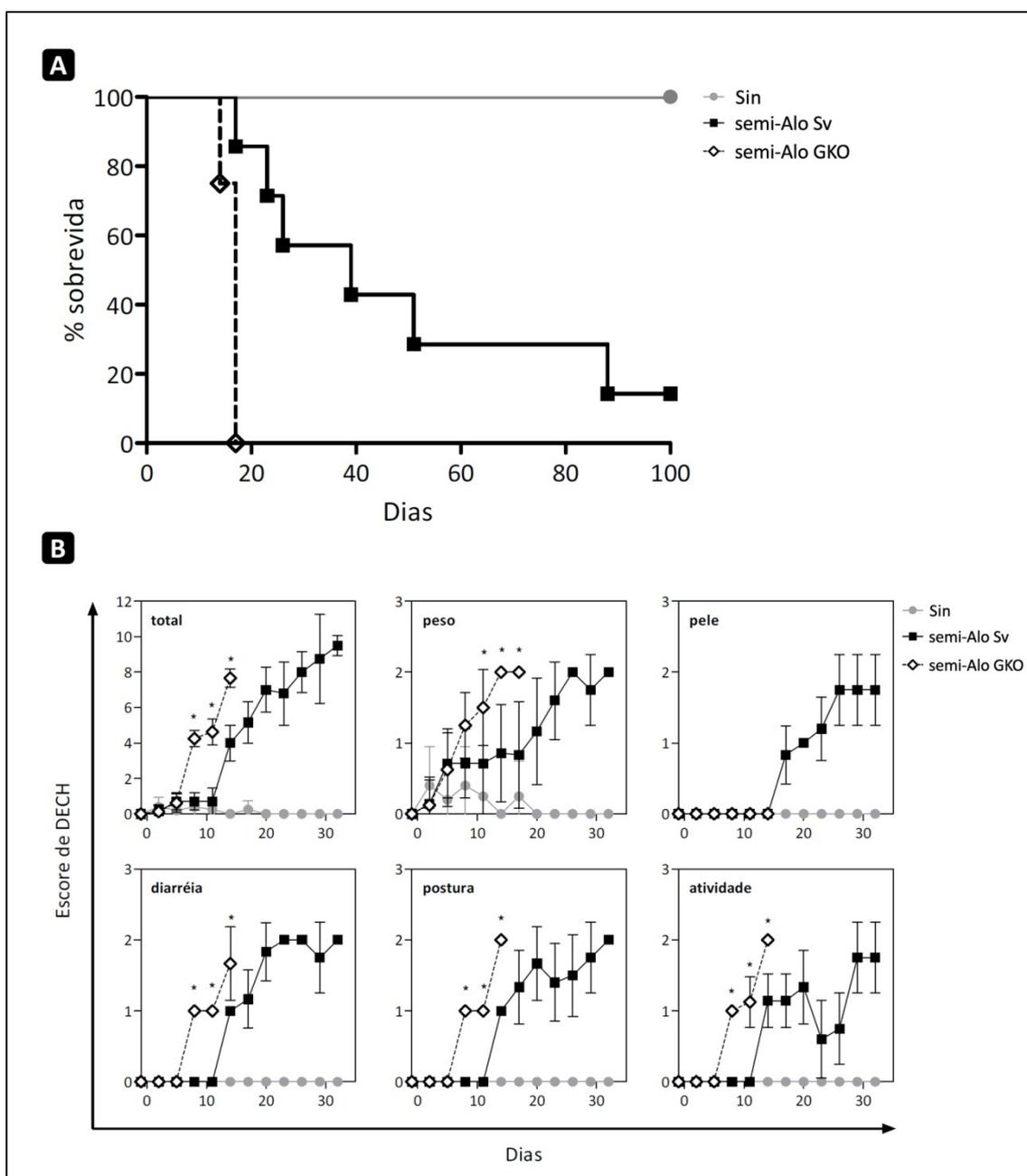


Figura 11. Papel do IFN- γ das células do doador na aDECH exp. Receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6 e 5×10^6 células CD3⁺ de baço total de BDF1 (Sin) ou de B6 (semi-Alo Sv) ou de GKO (semi-Alo GKO). Receptores e doadores machos. Animais por grupo: Sin – 5; semi-Alo Sv – 7; semi-Alo GKO – 8. **A)** Mortalidade. **B)** Escore clínico de DECH. * $p < 0,05$.

Para confirmar que este é um efeito da ausência de IFN- γ nas células do doador, foi realizado um transplante com animais Sv ou GKO como receptores, onde os mesmos foram irradiados e transplantados com MO de BALB/c ou MO e células T de BALB/c (**Figura 12**). Os resultados mostram que a ausência de IFN- γ no receptor não influencia a mortalidade relacionada à DECH.

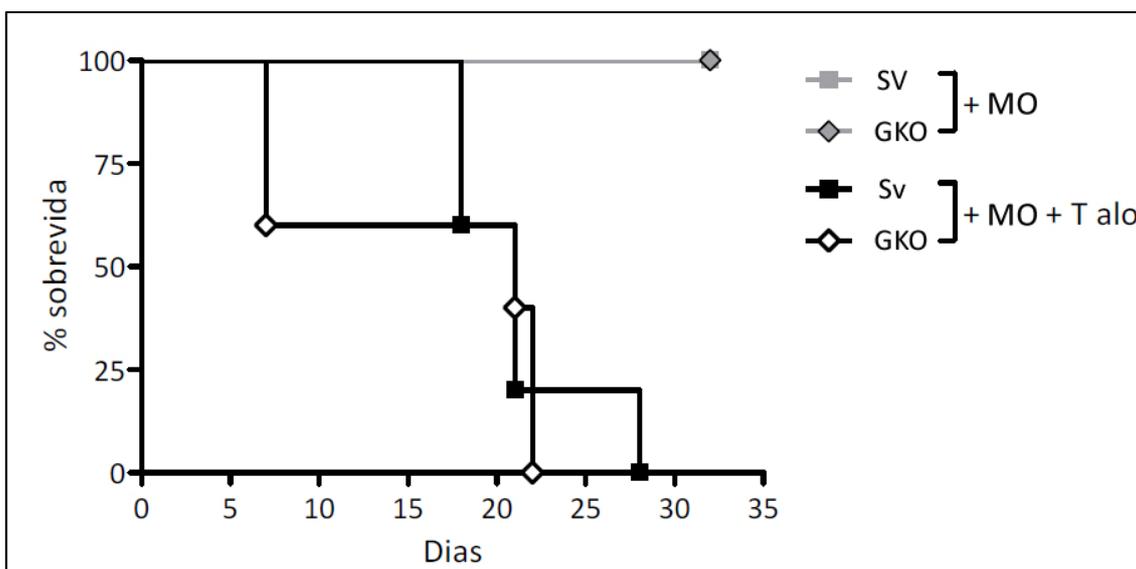


Figura 12. Papel do IFN- γ do receptor na mortalidade associada à aDECH exp.. Receptores B6 e GKO foram irradiados e transplantados com $1,5 \times 10^7$ MO total de BALB/c (MO) ou com MO e 5×10^6 células CD3⁺ de baço total de BALB/c (MO + T alo). Receptores fêmeas e doadores machos. Cinco animais por grupo.

Na Encefalomielite Autoimune Experimental (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - EAE*), uma doença descrita inicialmente como dependente de IFN- γ , foi verificado que animais deficientes de IFN- γ ficavam doentes e apresentavam grandes concentrações de IL-17A (Komiya, Nakae *et al.*, 2006). Para verificar se a DECH mais severa observada nos animais receptores de células GKO estava relacionada a uma produção exacerbada de IL-17A, a produção dessa citocina por linfócitos T do doador foi avaliada por citometria. Para permitir a avaliação conjunta da

produção de IFN- γ e IL-17A em linfócitos T do doador por citometria de quatro cores, foi utilizado o modelo B6 \rightarrow BALB/c, onde há disparidade total de MHC, de forma que a marcação do MHC apenas do doador pudesse ser utilizada para diferenciar essas células das do hospedeiro. Animais BALB/c foram irradiados e transplantados com MO total de B6 ou MO e células T alogeneicas Sv ou GKO (**Figura 13**). A ausência de IFN- γ nas células do doador leva a uma mortalidade mais rápida também nesse sistema (**Figura 13 A**). A avaliação de alterações histológicas nos órgãos alvo da DECH por escore de patologia (Descrição no item **3.12.3** dos Materiais e Métodos) demonstrou a ocorrência de uma doença mais acentuada na pele e no cólon dos receptores de células GKO, com tipos de alteração muito semelhantes na pele em comparação com os receptores de células Sv, e alterações quantitativamente semelhante no fígado, porém com aspectos mais graves no grupo receptor de células GKO (escore: **Figura 13 B**; fotos: **13 C a K** – descrições na **Tabela 4**). As fotografias e as descrições apresentadas são representativas de dois animais avaliados por grupo. A avaliação da produção de citocinas, 11 dias após o transplante, por células do doador, em linfonodos mesentéricos, periféricos e no baço, mostrou um grande percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ Sv produzindo IFN- γ , com ausência de produção importante de IL-17A por essas células (**Figura 13 M e N**). A produção dessas citocinas não foi observada em células T CD4⁺ e CD8⁺ de doadores GKO (**Figura 13 M e N**). Do total de células do doador, um pequeno percentual de produção de IL-17A foi observado pelas células GKO no baço dos receptores, porém a mesma produção foi observada entre as células totais de doadores Sv (**Figura 13 L**). A produção simultânea de IFN- γ e IL-17A não foi observada em nenhum dos grupos.

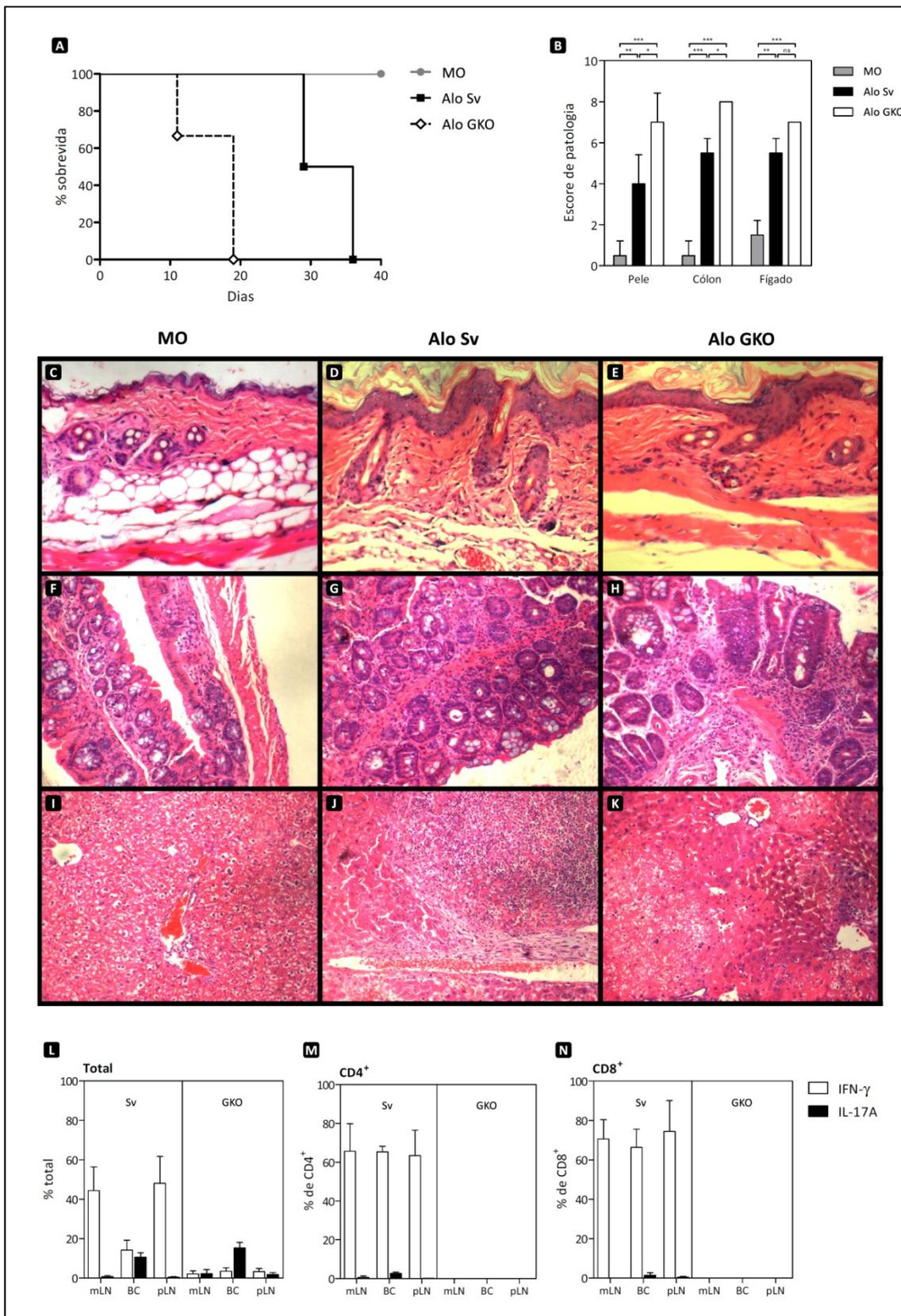


Figura 13. Papel do IFN- γ na aDECH exp. Receptores BALB/c foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6 (MO) ou com MO e 2×10^6 células CD3⁺ de baço total de B6 (Alo Sv) ou de GKO (Alo GKO). Receptores fêmeas e doadores machos. Cinco animais por grupo. **A)** Mortalidade. **B – N)** Análises em animais representativos dos respectivos grupos 11 dias após o transplante. **B)** Escore histopatológico; dois animais por grupo. * $p < 0,05$ /** $p < 0,01$ /** $p < 0,001$ / ns (não significativo). **C – K)** Fotos representativas dos cortes de Pele (**C, D, E**), Cólon (**F, G, H**) e Fígado (**I, J, K**) avaliados em **B**, dos grupos MO (**C, F, I**), Alo Sv (**D, G, J**) e Alo GKO (**E, H, K**), todas com aumento de 200x. **L, M e N)** Avaliação da produção de IFN- γ e IL-17A (dois animais por grupo) por células do doador nos Linfonodos mesentéricos (mLN), periféricos (pLN) ou Baço (BC) (Regiões - **Fig. Sup. 3.**). Percentual de células do doador (H-2D^{b+}) totais (**L**), CD4⁺ (**M**) ou CD8⁺ (**N**), Sv ou GKO (indicado no gráfico), produzindo citocinas.

Tabela 4. Descrição das histopatologias da **Figura 13**

	MO	Alo Sv	Alo GKO
PELE	Pele normal, incluindo epitélio com características típicas, tecido conjuntivo, presença de anexos córneos (folículos pilosos e glândulas) e tecido adiposo.	Espessamento do revestimento epitelial, com aumento da quantidade queratina e do número de camadas celulares no epitélio pavimentoso, desarranjo da camada basal, com presença de células apoptóticas (disceratose), espessamento do tecido conjuntivo subcutâneo, redução e atrofia dos anexos corneos, infiltrado mononuclear disperso.	Espessamento do revestimento epitelial, com aumento da quantidade queratina e do número de camadas celulares no epitélio pavimentoso, desarranjo da camada basal, com presença de células apoptóticas (disceratose), espessamento do tecido conjuntivo subcutâneo, redução e atrofia dos anexos córneos, infiltrado mononuclear disperso.
CÓLON	Cólon sem alterações patológicas. Estrutura preservada, podendo-se observar a borda epitelial colunar íntegra, presença de glândulas em quantidade normal na mucosa, submucosa e camadas musculares sem alterações.	Cólon alterado, com infiltração mononuclear, mucosa hiperplásica.	Cólon alterado, com extenso infiltrado mononuclear estendendo-se até camadas profundas da parede intestinal, mucosa hiperplásica, desorganizada, e destruição de áreas da borda epitelial.
FÍGADO	Áreas de tumefação hepática. Arquitetura do tecido preservada. Espaço porta livre de infiltração.	Grande abscesso hepático, com áreas de necrose de coagulação no entorno.	Extensa destruição do parênquima hepático, com inúmeras áreas de necrose e ilhas de hepatócitos em sofrimento.

4.4. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp.

Tendo em vista a participação do IFN- γ no efeito ECH, sua relação com o efeito ECL foi avaliada no modelo utilizando P815GFP. Animais BDF1 foram irradiados e transplantados com MO de B6 (depletada de células T) em conjunto com células T esplênicas singeneicas, semi-alogeneicas Sv ou semi-alogeneicas GKO, recebendo ou não 10^5 células P815GFP. Neste transplante foi utilizada uma dose cinco vezes menor de células T, na tentativa de evitar que uma DECH exacerbada impedisse a visualização de possíveis diferenças no efeito ECL. Vinte e um dias após o transplante o percentual de células GFP⁺ foi avaliado no baço, fígado, linfonodos, medula óssea e sangue dos animais receptores de células leucêmicas (**Figura 14 A**). Os animais receptores de células T singeneicas têm células leucêmicas em todos esses locais, ocorrendo uma completa eliminação dessas células nos receptores de células T semi-alogeneicas Sv. Contudo, os animais que receberam células T semi-alogeneicas GKO apresentaram um padrão diferente dos anteriores, com um efeito ECL semelhante ao Sv nos linfonodos e a sugestão de um efeito parcial nos demais locais (no entanto, a variação encontrada no baço e a ausência de diferença na análise estatística em relação ao grupo singeneico no fígado, MO e sangue, implicam em grande incerteza em relação a este efeito parcial nestes casos). No que diz respeito ao efeito ECH, animais que receberam ou não células leucêmicas apresentaram parâmetros clínicos associados à DECH muito parecidos, e escore total de DECH também semelhante (**Figura 14 B**). Entre os animais receptores de células T semi-alogeneicas Sv ou GKO, não foram observadas diferenças importantes no escore de DECH em 21 dias, o que pode ser devido à utilização de uma dose menor de células T nesse experimento.

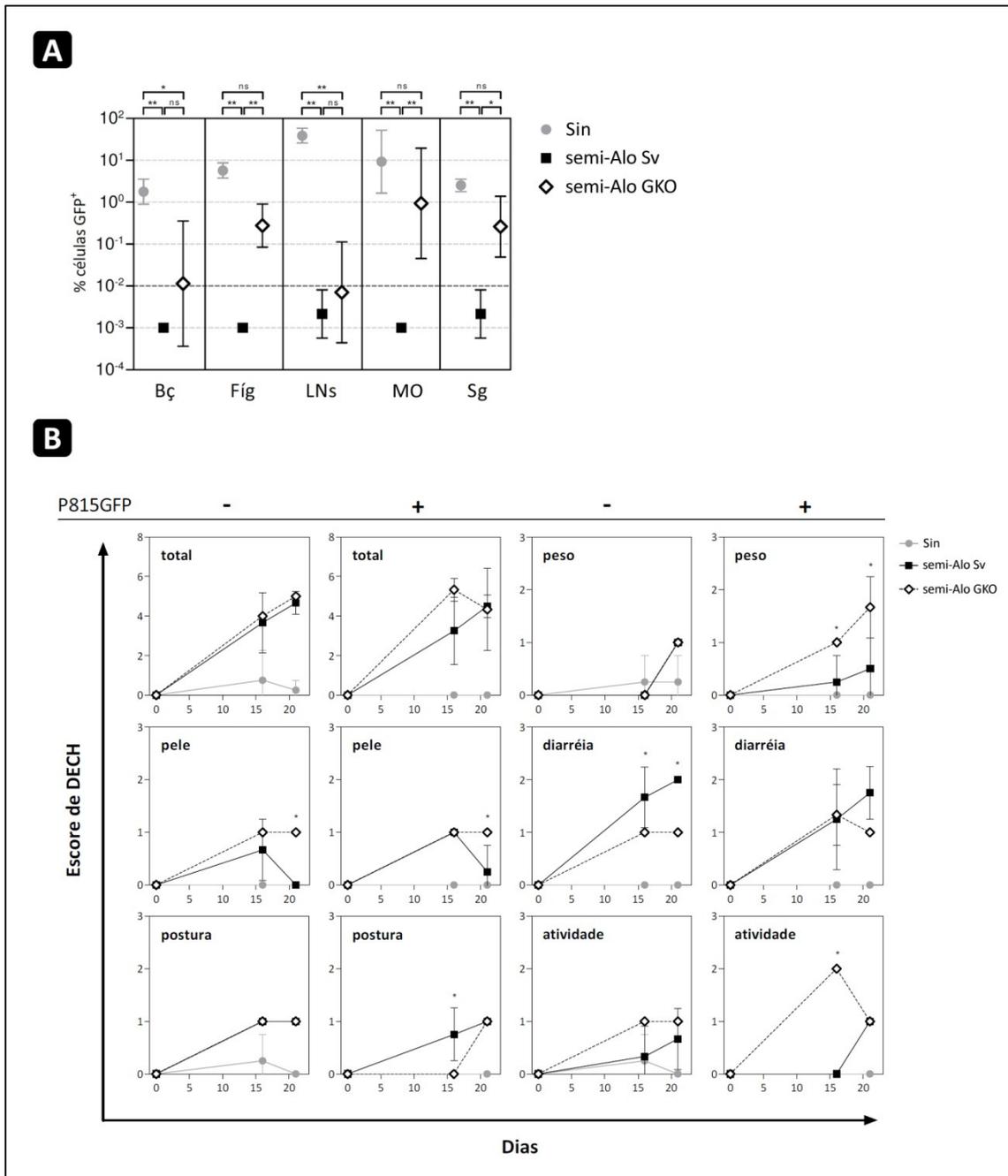


Figura 14. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp: sistema semi-alogeneico. Receptores BDF1 foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO (depletada de células T) de B6 e 10^6 células CD3⁺ de baço total de BDF1 (Sin) ou de B6 (semi-Alo Sv) ou de GKO (semi-Alo GKO), recebendo ou não 10^5 células P815GFP. Receptores fêmeas e doadores machos. Quatro animais por grupo. **A**) Percentual de células GFP⁺ 21 dias após o transplante no Baço (Bç), Fígado (Fíg), Linfonodos (LNs – agrupamento de mesentéricos, inguinais, axilares, braquiais, poplíteos, para-aórticos e cervicais), Medula Óssea (MO) ou Sangue (Sg) dos animais nos grupos receptores de P815GFP. O limite de detecção (10^{-2}) é mostrado em destaque. * $p < 0,01$ /** $p < 0,001$ / ns (não significativo) **B**) Escore clínico de DECH, nos receptores dos respectivos grupos, recebendo ou não P815GFP (indicação superior). * $p < 0,05$.

A análise do escore de patologia dos grupos receptores de células leucêmicas, mostrada na **Figura 15 A**, não mostrou diferenças quantitativas de alterações na pele, contudo sugeriu a presença de alterações discretamente menores no cólon e significativamente maiores no fígado dos receptores de células GKO. No entanto, ocorreram diferenças qualitativas entre as patologias dos receptores de células Sv e GKO, mostradas nas fotos das histologias (**Figura 15 B a J** - descrições na **Tabela 5** - representativas de três animais por grupo), principalmente no fígado, onde as alterações se encontram mais concentradas nos espaços vasculares nos receptores de células Sv e mais concentradas no parênquima nos receptores de células GKO (**Figura 15 I e J e Tabela 5**).

Esses resultados mostraram que o efeito ECL na MO e no fígado depende de IFN- γ no sistema semi-Alogeneico, e sugerem que não há esta dependência nos órgãos linfóides secundários. Além disso, com relação ao efeito ECH, a presença de leucemia parece modificar o padrão patológico.

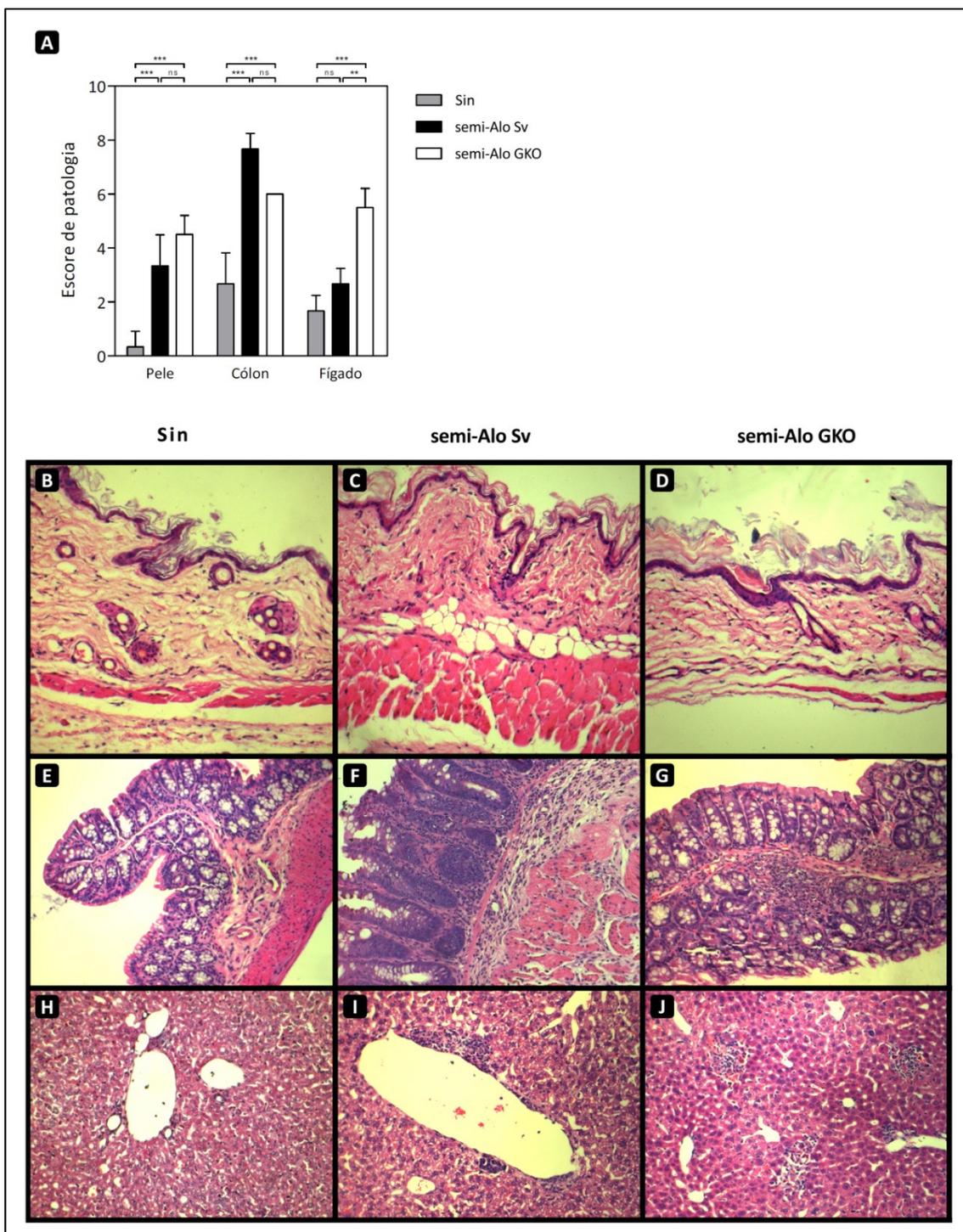


Figura 15. Análises histológicas dos animais que receberam P815GFP da **Figura 14**. **A)** Escore histopatológico dos animais que receberam P815GFP dos respectivos grupos; três animais por grupo. * $p < 0,05$ /****** $p < 0,01$ /******* $p < 0,001$ / ns (não significativo). **B – J)** Fotos representativas dos cortes de Pele (**B, C, D**), Cólon (**E, F, G**) e Fígado (**H, I, J**) avaliados em **A**, dos grupos Sin (**B, E, H**), semi-Alo Sv (**C, F, I**) e semi-Alo GKO (**D, G, J**), todas com aumento de 200x.

Tabela 5. Descrição das histopatologias da **Figura 15**

	Sin	semi-Alo Sv	semi-Alo GKO
PELE	Pele sem alterações.	Pele com espessamento do tecido conjuntivo e redução do número de anexos córneos	Pele com alterações do revestimento epitelial, aumento do número de camadas celulares no epitélio pavimentoso, espessamento da camada de queratina e redução/atrofia dos anexos córneos.
CÓLON	Cólon normal.	Extensa infiltração mononuclear de todas as camadas da parede intestinal, mucosa hiperplásica e desorganizada. Destrução de áreas da borda epitelial.	Cólon com áreas focais de infiltração mononuclear na mucosa. Demais camadas preservadas.
FÍGADO	Fígado exibindo discreta tumefação. Espaços vasculares sem alterações.	Fígado exibindo discreta tumefação. Infiltração do espaço porta por células mononucleares, sem destruição das estruturas vasculares / ducto biliar.	Fígado exibindo áreas focais de destruição parenquimatosa e infiltração por células polimorfonucleares.

Para avaliar se as diferenças no efeito ECL das células Sv e GKO poderiam ser explicadas com relação à produção de citocinas, o modelo de P815GFP foi utilizado no sistema alogeneico B6→BALB/c. Receptores BALB/c foram irradiados e transplantados com MO de B6 (depletada de células T), 10^5 células P815GFP e células T alogeneicas Sv ou GKO (**Figura 16**). Novamente foi utilizada uma dose menor de células T, em relação à dose utilizada neste modelo, na tentativa de evitar que uma DECH exacerbada impedisse a visualização de possíveis diferenças no efeito ECL, que seria avaliado pelo percentual de células leucêmicas no sangue dos receptores. Contudo, com o objetivo de também não impedir a visualização de diferenças no efeito ECH, a dose de células T não foi reduzida cinco vezes, como no transplante anterior, mas apenas duas vezes. Foi utilizada, portanto, a mesma dose de células T empregada no transplante semi-alogeneico apresentado nas **figuras 14 e 15**, 10^6 células $CD3^+$ de baço total, que é metade da dose utilizada no transplante alogeneico apresentado na **figura 13**.

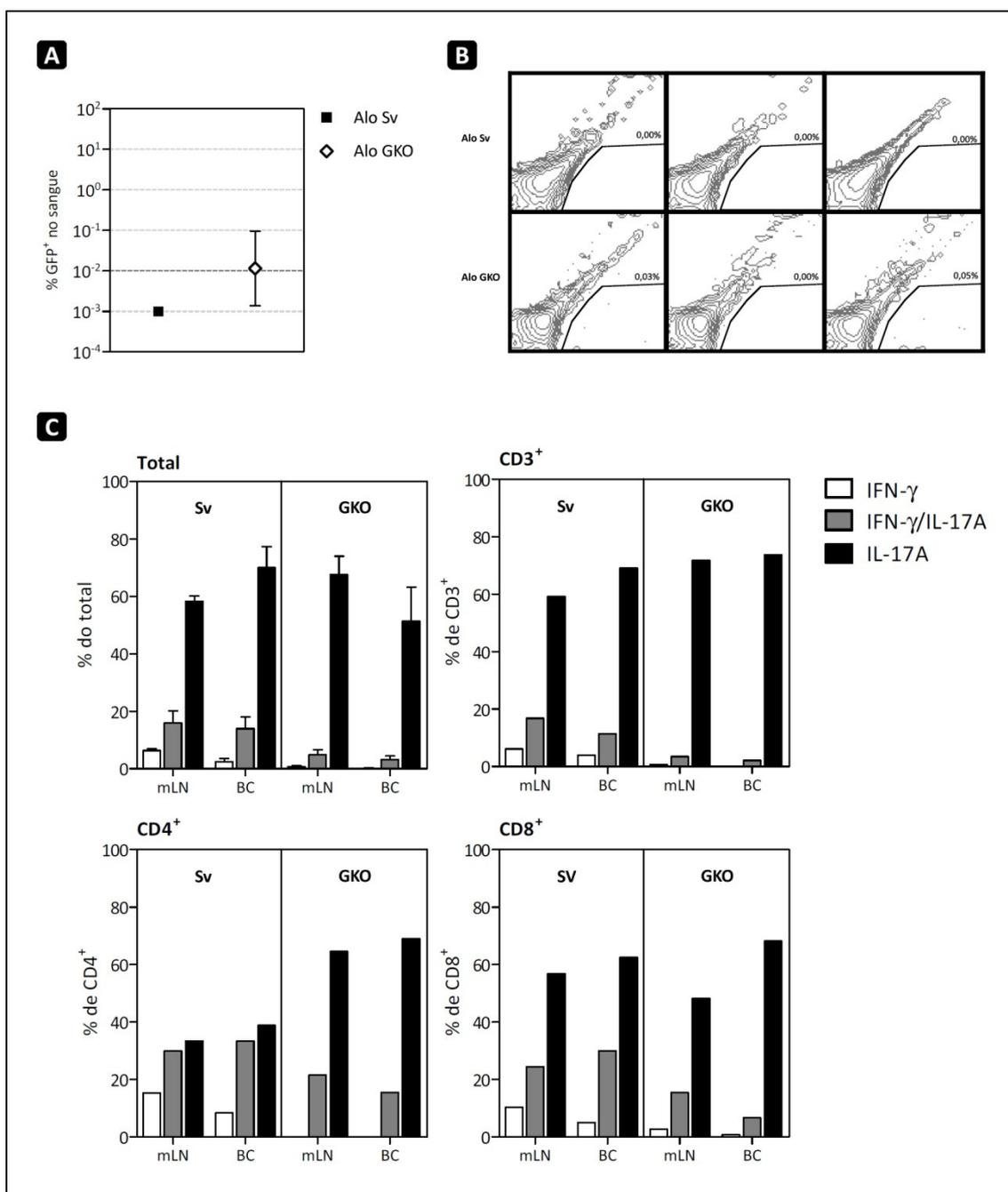


Figura 16. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp: sistema alógeno. Receptores BALB/c foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO (depletada de células T) de B6, 10^5 células P815GFP e 10^6 células CD3⁺ de baço total de B6 (Alo Sv) ou de GKO (Alo GKO). Receptores fêmeas e doadores machos. Seis animais por grupo. As análises foram realizadas 19 dias após o transplante. **A)** Percentual de células GFP⁺ no Sangue dos receptores dos respectivos grupos. O limite de detecção (10^{-2}) é mostrado em destaque. **B)** Gráficos representativos dos dados mostrados em **A**. **C)** Avaliação da produção de IFN- γ e IL-17A (agrupamento de três animais por grupo) por células do doador nos Linfonodos mesentéricos (mLN) ou Baço (BC) dos receptores. Os gráficos mostram o percentual de células do doador (H-2D^b +) Total, CD3⁺, CD4⁺ ou CD8⁺, Sv ou GKO (indicação no gráfico), produzindo citocinas (Regiões na Fig. Suplementar 4).

Um grupo de animais recebeu apenas MO depletada de células T e 10^5 P815GFP, porém todos os animais morreram uma semana após o transplante de forma fulminante, sendo encontrados já em início de decomposição, não sendo possível determinar o que causou esta mortalidade (dados não mostrados).

Nas análises, realizadas 19 dias após o transplante, o percentual de células GFP⁺ no sangue dos animais receptores apresentou apenas uma pequena diferença entre os grupos (**Figura 16 A**), com um discreto aparecimento de células GFP⁺ no sangue de receptores de células T GKO (**Figura 16 B**). Quanto à produção de citocinas (**Figura 16 C**), um grande percentual de células produtoras de IL-17A foi observado nos dois grupos, em linfonodos mesentéricos e no baço (o número de células de linfonodos periféricos foi insuficiente para a marcação intracitoplasmática após o tratamento com PMA, Ionomicina e Monensina, mesmo agrupando-se de três animais). Foram também observadas células produtoras de IFN- γ e IL-17A nos dois grupos, porém em menor quantidade nos animais receptores de células GKO. A presença de células produtoras de IFN- γ no grupo receptor de células GKO pode ser devida a uma depleção incompleta de células T da MO, uma vez que MO de animais Sv foi utilizada nos dois casos para restringir as comparações às células esplênicas infundidas. A eficiência de depleção de células T na MO, neste experimento, avaliada pelo percentual de células CD3⁺, foi de 85%, restando 0,39% de células CD3⁺ na MO injetada (Figura Suplementar 5). Sendo injetadas 5×10^6 células de MO em cada receptor, são injetadas, portanto, $1,95 \times 10^4$ células CD3⁺ Sv de MO em cada animal, e sendo injetadas 10^6 células CD3⁺ esplênicas neste transplante, pode-se concluir que aproximadamente 2% das células CD3⁺ injetadas no grupo receptor de células T GKO são Sv, número muito próximo do

percentual de células CD3⁺ produzindo IFN- γ nos mLNs e baço dos receptores de células GKO (4,2% e 2,3%, respectivamente – **Figura 16 C**, CD3⁺).

Assim como no experimento apresentado na **Figura 14**, não houve diferença no escore total de DECH entre os grupos, sendo apenas o escore de diarreia do grupo receptor de células GKO ligeiramente maior (**Figura 17 H**), o que pode ser devido à utilização de uma dose menor de células T. Em contraste, o escore de patologia do cólon no grupo GKO foi menor quando comparado ao grupo Sv, sendo maior no fígado e de semelhante intensidade na pele (**Figura 17 H**). As alterações na pele e no fígado são qualitativamente diferentes (**Figura 17 B a G** – descrições na **Tabela 6**) entre os grupos Sv e GKO. Assim como no experimento anterior (**Figura 15 I e J e Tabela 5**), as alterações no fígado encontram-se principalmente nos espaços vasculares no grupo Sv e mais concentradas no parênquima no grupo GKO (**Figura 17 F e G e Tabela 6**).

Em conjunto, esses dados mostram que a presença de leucemia modifica o padrão patológico também no sistema alogeneico e altera completamente o perfil de produção de citocinas. Além disso, os animais receptores de células T GKO apresentam percentual discreto de células leucêmicas no sangue, em contraste com o resultado obtido no modelo semi-alogeneico, apresentado na **figura 14 A**. Contudo, pode ser que a avaliação no sangue não reflita, de forma direta, o que acontece nos tecidos com relação ao ECL.

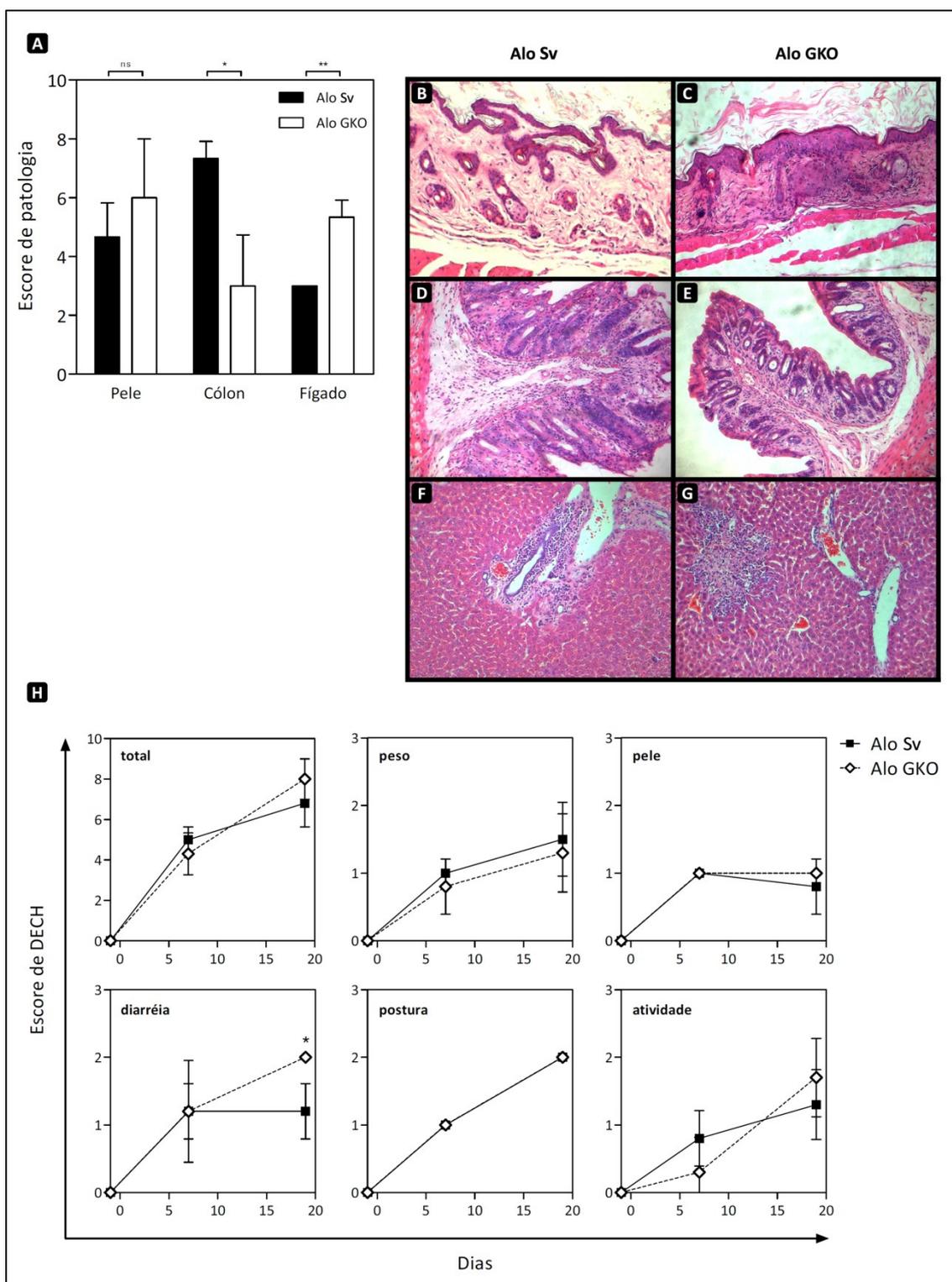


Figura 17. Avaliação de parâmetros associados à DECH nos animais da **Figura 16.** **A)** Escore histopatológico; três animais por grupo. * $p < 0,05$ /** $p < 0,01$ /** $p < 0,001$ / ns (não significativo) **B – G)** Fotos representativas dos cortes de Pele (**B** e **C**), Cólon (**D** e **E**) e Fígado (**F** e **G**) avaliados em **A**, dos grupos Alo Sv (**B**, **D**, **F**) e Alo GKO (**C**, **E**, **G**), todas com aumento de 200x. **H)** Escore de DECH. * $p < 0,05$

Tabela 6. Descrição das histopatologias da **Figura 17**

	Alo Sv	Alo GKO
PELE	Pele exibindo espessamento epitelial e da queratina, espessamento do tecido conjuntivo e atrofia/redução do número de anexos córneos.	Pele exibindo intensas alterações epiteliais, grande espessamento da camada epitelial, disqueratose, espessamento do tecido conjuntivo, ausência de anexos córneos e região de ulceração epitelial.
CÓLON	Intensa infiltração mononuclear na mucosa e submucosa, hiperplasia das glândulas mucosas, destruição de áreas da borda epitelial.	Infiltração mononuclear na mucosa e submucosa, discreta hiperplasia glandular.
FÍGADO	Acometimento basicamente do espaço porta, com infiltração mononuclear, alargamento do espaço porta e destruição das estruturas da tríade portal.	Áreas de destruição do parênquima com infiltração mononuclear que parecessem o início da formação de um abscesso, discreta infiltração mononuclear do espaço porta.

Para avaliar se as diferenças encontradas no efeito ECL em diferentes locais, entre os grupos Sv e GKO no transplante semi-alogeneico apresentado na **Figura 14**, ocorrem também no modelo alogeneico de B6→BALB/c, um experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento alogeneico anterior (apresentado nas **Figuras 16 e 17**) (exceto pela utilização de MO total, e não de MO depletada de células T, como grupo controle negativo para a doença). Receptores BALB/c foram irradiados e transplantados com MO total de B6 e 10^5 células P815GFP ou com MO (depletada de células T) de B6, 10^5 células P815GFP e células T alogeneicas Sv ou GKO. Vinte dias após o transplante os animais foram avaliados quanto ao percentual de células GFP⁺ no baço, fígado, linfonodos, medula óssea (agrupamento de 6 animais por grupo) e no sangue (individual) e quanto aos parâmetros clínicos de DECH (**Figura 18**).

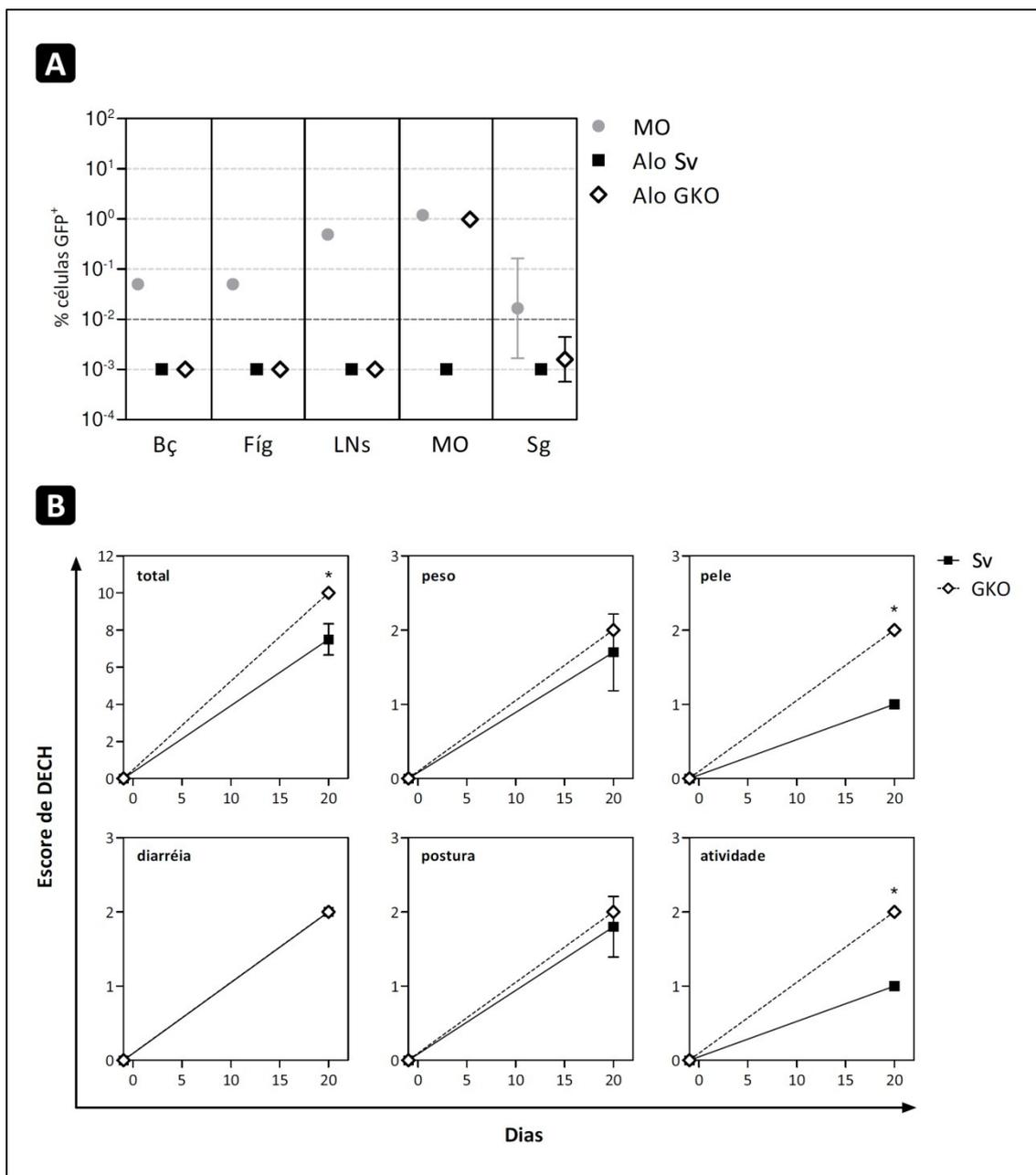


Figura 18. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp: sistema alogeneico. Receptores BALB/c foram irradiados e transplantados com 5×10^6 MO total de B6 e 10^5 células P815GFP (MO) ou com 5×10^6 MO (depletada de células T) de B6, 10^5 células P815GFP e 10^6 células CD3⁺ de baço total de B6 (Alo Sv) ou de GKO (Alo GKO). Receptores fêmeas e doadores machos. Seis animais por grupo. As análises foram realizadas 20 dias após o transplante. **A**) Percentual de células GFP⁺ no Baço (Bç), Fígado (Fíg), Linfonodos (LN_s – agrupamento de mesentéricos, inguinais, axilares, braquiais, poplíteos, para-aórticos e cervicais), Medula Óssea (MO) ou Sangue (Sg) dos receptores dos respectivos grupos (Bç, Fíg, LN_s e MO – agrupamento dos animais; Sg – individual). O limite de detecção (10^{-2}) é mostrado em destaque. **B**) Escore de DECH. * $p < 0,05$

No grupo controle negativo, que recebeu apenas MO e células leucêmicas, foram observadas células GFP⁺ em todos os locais avaliados, com um percentual maior nos linfonodos e na medula óssea (**Figura 18 A**). Nos animais receptores de células alogeneicas Sv não são encontradas células GFP⁺. Entretanto, no grupo que recebeu células alogeneicas GKO, células leucêmicas foram encontradas apenas na medula óssea, em quantidade semelhante à do grupo controle negativo para a doença.

Diferente do que foi visto no experimento anterior (**Figura 17 H**), pode ser observado um escore de DECH ligeiramente maior no grupo GKO, com uma diferença principalmente no escore clínico de pele e atividade (**Figura 18 B**).

Estes resultados mostraram uma ausência total de efeito ECL na medula óssea no grupo receptor de células T GKO, enquanto foi observado, ao mesmo tempo, um efeito ECL completo no baço, fígado e linfonodos. Pôde-se observar também que células GFP⁺ não são encontradas no sangue da maioria dos animais deste grupo, mesmo estando presentes na MO.

5. DISCUSSÃO

Para o estudo dos mecanismos envolvidos com os efeitos ECH e ECL é de grande importância a avaliação de múltiplos parâmetros, uma vez que esses efeitos têm grande sobreposição (Appelbaum; Bleakley e Riddell). Por este motivo, novos parâmetros de avaliação da DECH foram somados aos já utilizados em nosso laboratório (mortalidade, perda de peso e patologia de intestino), como apresentado no item **4.1** da seção de **Resultados**, e um método mais preciso foi utilizado para avaliar o efeito ECL, como apresentado no item **4.2**. Sendo assim, obtivemos um modelo capaz de discriminar e efetivamente quantificar os efeitos ECH e ECL.

O sistema de avaliação de aDECH experimental mais utilizado na literatura [3] avalia perda de peso, alterações na atividade e postura, e alterações no pêlo e na pele. Porém, em nossos experimentos, foi observado que as alterações na pele só ocorrem de fato após alterações importantes no pêlo, estando estes dois parâmetros assim intimamente ligados, pois se tratam de alterações ocorridas no mesmo órgão. Por este motivo, em nosso sistema esses dois parâmetros foram agrupados, com alterações apenas no pêlo sendo consideradas alterações de pele moderadas (escore 1) e perda de pêlo acompanhada de lesões na pele consideradas alterações severas (escore 2). O sistema original citado (Cooke, Kobzik *et al.*) não levava em conta a diarreia, um parâmetro que pode ser indicativo da saúde do intestino, órgão de grande importância na aDECH. A avaliação das fezes como indicativo de diarreia já foi usado em outro trabalho como única variável para avaliação de DECH clínica (Brok, Heidt *et al.*, 1993),

e foi incorporada em nosso sistema, somando-se às avaliações de pêlo/pele, peso, postura e atividade.

Além da avaliação quantitativa, na forma do escore total, os escores para cada um dos parâmetros clínicos avaliados dão uma perspectiva qualitativa ao sistema. Da mesma forma, a avaliação das alterações histopatológicas pode ser feita de forma quantitativa (escore) e também de forma qualitativa (tipo de alteração). De um modo geral, isto permite uma avaliação mais completa do sistema, que pode favorecer a identificação de relações mais claras entre os mecanismos celulares e humorais de desenvolvimento da DECH e as apresentações clínicas avaliadas.

A taxa de mortalidade, a morbidade e o tempo de início da DECH em animais que recebem o mesmo número de células T alogeneicas varia entre transplantes realizados em momentos diferentes, sendo essas variações observadas em nossos experimentos e também documentadas na literatura (Nikolic, Lee *et al.*, 2000). Isto é provavelmente devido a variações na carga parasitária e na flora comensal dos animais receptores e talvez até nos doadores. Como as fases iniciais da DECH estão ligadas à ativação da imunidade inata pelo reconhecimento de PAMPs em microorganismos, a DECH experimental é tão mais grave quanto mais elevada for a carga parasitária na colônia de animais (Van Bekkum, Roodenburg *et al.*, 1974). Por este motivo, para tentar manter a reprodutibilidade dos parâmetros relacionados à DECH entre os experimentos, o tratamento dos animais ou não com água ácida e variações na dose de células T são utilizados, sempre levando em conta grandes variações percebidas nos grupos “controle positivo” dos transplantes realizados em nosso laboratório. Nos transplantes das **Figuras 8 B, 9 e 10** os animais foram tratados com água ácida após o transplante, pois este tratamento era utilizado em nosso grupo à época em que foram

realizados esses experimentos para diminuir a rapidez com que a doença se desenvolvia. No entanto, com o tempo foi observada uma diminuição na mortalidade associada à DECH nos grupos tratados com água ácida, provavelmente devido a uma diminuição na carga parasitária da colônia de animais, e este tratamento deixou de ser utilizado, fato que explica a ausência do mesmo tratamento nos demais experimentos. A possibilidade de monitorar mais claramente o sistema, através da mortalidade e dos escores clínico e de patologia, melhora a comparação de experimentos diferentes e pode auxiliar na normalização das variações normalmente encontradas.

Os modelos de ECL associado à DECH até hoje apresentados na literatura utilizam principalmente avaliação da presença de nódulos tumorais ou apenas avaliam mortalidade, salvo alguns modelos que utilizam bioluminescência para quantificar e localizar as células leucêmicas (Zeiser, Nguyen *et al.*, 2006; Duran-Struuck, Tawara *et al.*, 2007). Em nosso caso, optamos por um método onde conseguíssemos quantificar a leucemia e ainda pudéssemos acompanhar a evolução da mesma em paralelo à evolução da aDECH. No modelo aqui montado, com células P815, observamos a presença de tumores em diversos órgãos, além de hepatomegalia ou paralisia. Esses dois últimos parâmetros citados poderiam ser utilizados para avaliar doença leucêmica, mas a grande variação encontrada nessas manifestações entre os animais nos levou ao uso de uma linhagem celular fluorescente, P815GFP, que nos permitiu quantificar a doença nos diversos órgãos, por citometria de fluxo, e possibilitou a avaliação do efeito anti-leucemia exercido pelas células do doador. Uma vantagem a mais deste sistema é a possibilidade de analisar a presença da leucemia no sangue periférico do animal, sem necessidade de sacrifício do mesmo, viabilizando o acompanhamento da progressão de ambos, aDECH e leucemia. Além da identificação

da população leucêmica por citometria de fluxo, PCR quantitativo (qPCR) pode ser outra alternativa técnica, podendo ser até 100 vezes mais sensível que a citometria de fluxo para quantificação absoluta (1 célula em 10^4 na citometria, 1 célula em 10^6 por qPCR (Khosrotehrani, Johnson *et al.*, 2005)). A quantificação de células P815GFP por qPCR, que está em fase de padronização no laboratório, permitirá o estudo do efeito ECL mais precocemente, podendo fornecer evidências de quando esse efeito se inicia, em qual fase da DECH atinge seu pico e de qual o efeito da resposta imune no estabelecimento da malignidade.

Como pode ser observado nas **Figuras 10, 14 e 18**, os animais receptores de células leucêmicas nos grupos controle negativo para a DECH (receptores apenas de MO ou de células T singeneicas: MO ou Sin) apresentam células GFP⁺ no sangue, baço, linfonodos, fígado e medula óssea, o que não influencia na quantificação da DECH pelo escore clínico e de patologia (**Figuras 14 e 15**). Já nos receptores de células leucêmicas nos grupos controle positivo para a DECH (receptores de células T de B6: semi-alo Sv ou alo Sv) pode ser observada uma completa eliminação da leucemia, uma vez que células GFP⁺ não são observadas em nenhum dos locais avaliados (**Figuras 14 e 18**), e a DECH é efetivamente identificada e quantificada pela avaliação clínica e de patologia. Sendo assim, podemos concluir que em nosso sistema conseguimos discriminar e quantificar de forma precisa os efeitos ECH e ECL, além de poder avaliar qualitativamente aspectos envolvidos com cada um deles, como a localização do efeito ECL e a diferenciação de aspectos clínicos e patológicos dos parâmetros de DECH.

Dentre os inúmeros fatores e células envolvidos com os efeitos ECH e ECL, o IFN- γ tem sido muito estudado, porém não há uma definição clara de seu papel. A DECH é considerada uma doença Th1, apesar das evidências pró e contra essa consideração

não serem claras, e o papel de diferentes citocinas tem sido analisado com resultados pouco elucidativos. Se por um lado o tratamento com anticorpo anti-IFN- γ inibe o desenvolvimento da aDECH experimental (Mowat, 1989; Brok, Heidt *et al.*, 1993), por outro a administração da própria citocina não tem efeito potenciador da doença e ao contrário também a inibe (Brok, Heidt *et al.*, 1993). Corroborando este último dado, foi mostrado que o tratamento com IL-12, sabidamente estimuladora de resposta Th1 e da produção de IFN- γ , também inibe a doença e é acompanhado do aumento de IFN- γ no período inicial pós-transplante (Sykes, Szot *et al.*, 1995). O tratamento com anticorpo anti-IFN- γ em animais que recebem IL-12 ou a utilização de animais deficientes em IFN- γ (GKO) como doadores, elimina o efeito protetor conferido pela IL-12, o que confirma a hipótese de que o IFN- γ é o mediador da inibição dependente de IL-12 (Yang, Dey *et al.*, 1998). Além disso, transplante utilizando animais GKO como doadores resulta em uma aDECH mais severa, com acelerada mortalidade dos animais receptores (Murphy, Welniak *et al.*, 1998; Yang, Dey *et al.*, 1998; Yang, Qi *et al.*, 2002). Esse efeito é visto apenas quando as células do doador são GKO, uma vez que receptores GKO fazem DECH em mesmo grau que receptores Sv (Yang, Dey *et al.*, 1998). Como mostrado nas **Figuras 11 e 12**, esses dados são reproduzidos em nosso sistema, onde a deficiência de IFN- γ nas células do doador leva a exacerbação da doença. A explicação para este fato ainda não é clara.

Apesar do possível efeito inibitório do IFN- γ sobre a DECH, sem um efeito indutor não haveria doença. Alguma outra citocina e perfil deveria substituir o IFN- γ e o perfil Th1 para que haja progressão da DECH. Na realidade, como na ausência dessa citocina a doença é mais grave, imaginaríamos que uma citocina inibida pelo IFN- γ poderia ser responsável pela progressão da doença. De fato, na Encefalomielite Autoimune

Experimental (EAE), foi mostrado que a ausência da inibição mediada por IFN- γ leva a uma doença exacerbada (Chu, Wittmer *et al.*, 2000), e que na ausência de IFN- γ uma maior diferenciação para o perfil Th17 é observada (Komiyama, Nakae *et al.*, 2006). Para verificar se a DECH mais severa nos animais receptores de células GKO era devida a uma produção exacerbada de IL-17A, a produção dessa citocina por linfócitos T do doador foi avaliada por citometria no presente trabalho. Como mostrado na **Figura 13 M e N**, um grande percentual de células T do doador Sv é observado produzindo IFN- γ , mas não há produção de IL-17A pelas células T Sv ou GKO. Neste experimento não foi avaliada IL-4 ou outra citocina relacionada ao perfil Th2, e o papel desse perfil nesse sistema não pode ser descartado. Animais receptores de células T alogeneicas IL-4-KO têm uma mortalidade associada à DECH atrasada em relação aos controles, o que também sugere um papel para essa citocina na DECH (Murphy, Welniak *et al.*, 1998). Células deficientes em STAT-6, que participa na via de sinalização de IL-4, também induzem uma DECH um pouco mais lenta (Nikolic, Lee *et al.*, 2000), reforçando a necessidade de uma melhor avaliação do papel do perfil Th2 na DECH. De um modo geral, a ausência de consistência de resultados pode refletir uma avaliação pobre do sistema. Por isso, uma avaliação mais ampla da produção de citocinas, de perfis Th1, Th2 ou Th17, tanto nos órgãos linfóides secundários como nos tecidos atingidos pela doença, pode ajudar a cobrir melhor as lacunas de entendimento nos modelos de DECH. Apesar de não ter sido identificada, nesse ponto, uma relação entre a produção de IL-17A e a maior DECH nos receptores de células GKO em nosso modelo, em um trabalho recente é sugerida essa relação. Foi mostrada a produção de IL-17A por apenas 10% de células T de doador GKO em mLN 13 dias após o transplante de células esplênicas (Yi, Zhao *et al.*, 2008), evidenciando apenas uma fraca correlação entre a

produção de IL-17A e a DECH na ausência de IFN- γ . Nesse mesmo trabalho, é mostrado que células T deficientes de IL-17A podem induzir DECH e a doença é mais severa que a induzida por células Sv, o que é correlacionado no trabalho com uma maior diferenciação Th1. No entanto, em outro trabalho também recente, foi mostrado que células T CD4⁺ purificadas de animais deficientes de IL-17A induzem uma DECH igual à gerada por células Sv, sendo sugerido também nesse trabalho que as células deficientes de IL-17A realizam um efeito anti-leucemia semelhante ao realizado por células Sv (avaliação apenas por mortalidade) (Kappel, Goldberg *et al.*, 2009). Não se pode saber, no entanto, se essas discrepâncias são devidas à utilização de regime de condicionamento diferente entre os trabalhos (dose sub-letal no primeiro e letal no segundo), ou à diferença na fonte de células T indutoras de doença utilizadas (células esplênicas totais no primeiro e células CD4⁺ purificadas no segundo). De qualquer forma, talvez o perfil de citocinas produzido não seja o mais importante para determinação de doença, já que é possível induzir doença com células Th1 ou Th17, sendo a grande diferença entre elas os órgãos acometidos (Carlson, West *et al.*, 2009). Em alguns modelos de doença autoimune experimental, como EAE e gastrite autoimune, já é bem estabelecido que tanto células Th1 quanto Th17 podem mediar a doença, porém com padrões de doença distintos (Stromnes, Cerretti *et al.*, 2008; Stummvoll, Dipaolo *et al.*, 2008).

No presente trabalho a presença ou ausência de IFN- γ nas células T indutoras da aDECH modifica o padrão histopatológico, especialmente do fígado (**Figura 13**). Este, na ausência de IFN- γ se mostra quase que totalmente necrótico, com pouco tecido hepático sadio (**Figura 13 K**). Isto sugere um papel do IFN- γ na manutenção da integridade do fígado que pode ou não ser mediado por células da imunidade. Os tipos

celulares envolvidos ainda não foram estudados e podem compreender as células da imunidade inata intra-hepática como as células de Kupffer, que na ausência de IFN- γ ficariam mais sensíveis a morte mediada por células citotóxicas (Xaus, Cardo *et al.*, 1999).

Uma possível explicação para o aumento da DECH na ausência de IFN- γ seria não o desvio da produção de citocinas para um fenótipo Th2 ou Th17, mas os efeitos do IFN- γ sobre proliferação e morte celular. De fato, o efeito da IL-12 foi correlacionado com uma inibição na expansão inicial de células T alogeneicas, e esse efeito foi associado com a expressão de Fas pelas mesmas, pois não ocorre se células de doador deficiente de Fas são utilizadas (Dey, Yang *et al.*, 1998). Além disto, IFN- γ é capaz de induzir apoptose de linfócitos T ativados diretamente pela indução da expressão de moléculas intracelulares relacionadas a apoptose, como caspase 9, e extracelulares, como Fas e FasL, e ainda indiretamente pela indução da produção de óxido nítrico por células mielóides (Liu e Janeway, 1990; Novelli, Bernabei *et al.*, 1996; Novelli, D'elios *et al.*, 1997; Badovinac, Tvinnereim *et al.*, 2000; Li, Mckinstry *et al.*, 2007). O aumento na severidade da DECH relacionado à ausência de IFN- γ pode estar associado a uma expansão exacerbada de células T na ausência do mecanismo de AICD induzido por IFN- γ (Asavaroengchai, Wang *et al.*, 2007), como visto em outros modelos (Dalton, Pitts-Meek *et al.*, 1993; Chu, Wittmer *et al.*, 2000; Dalton, Haynes *et al.*, 2000; Refaeli, Van Parijs *et al.*, 2002; Li, Mckinstry *et al.*, 2007).

Outra questão também importante é o papel do IFN- γ no efeito ECL associado à DECH. Foi mostrado, em um modelo alogeneico de ECL, utilizando-se a observação de nódulos tumorais e a mortalidade como forma de avaliação da resposta anti-leucemia, que 50% dos receptores de células esplênicas GKO apresentavam tumor na autópsia,

apesar do efeito anti-hospedeiro exacerbado, enquanto 7% dos receptores de células Sv e 100% dos receptores de células singeneicas apresentavam tumores (Yang, Qi *et al.*, 2002). Foi concluído que células GKO realizam um efeito ECL mais fraco, em relação às células Sv. Não se pode, contudo, afirmar que os animais que não apresentavam tumores na autópsia eram livres de tumor, uma vez que seria necessária a utilização de técnicas mais sensíveis para que se possa descartar a possibilidade de doença residual. Os animais podem ter morrido de DECH em um dado momento em que ainda não apresentavam tumores sólidos visíveis na autópsia, e uma vez que a DECH é mais severa nos receptores de células T GKO a chance disso acontecer é maior.

Em nosso sistema, o efeito ECL pôde ser monitorado a nível celular, com a utilização da linhagem celular P815GFP. Foram realizados três experimentos para avaliação do papel do IFN- γ no ECL associado à DECH, um em sistema semi-alogeneico (**Figuras 14 e 15**) e dois experimentos idênticos em sistema alogeneico (**Figuras 16-18**). A quantidade de células leucêmicas (10^5) e de células T (10^6) transplantadas foi exatamente a mesma nos três experimentos, e as avaliações realizadas em torno de 20 dias após o transplante. Como esperado, e mostrado pelo score clínico de DECH nesses grupos, para um mesmo número de células T infundidas o efeito ECH tem magnitude menor no grupo semi-alogeneico (**Figuras 14 B, 17 H e 18 B**). Comparando-se os percentuais de células GFP⁺ entre os sistemas semi-alogeneico (**Figura 14 A**) e alogeneico (**Figura 18 A**), pode-se observar um efeito ECL completo em todos os locais nos receptores de células semi-Alo Sv ou Alo Sv, e a presença de células leucêmicas em todos os locais nos grupos controle negativo para a DECH (Sin e MO).

Com relação aos animais receptores de células GKO, ocorrem algumas diferenças entre os dois sistemas, mas principalmente com relação ao fígado e ao sangue (**Figura**

14 A e 18 A). Nos dois sistemas, ocorre eliminação das células leucêmicas nos LNs e baço dos animais receptores de células semi- ou Alo GKO, em magnitude comparada à do grupo Sv, guardando-se a grande variação individual observada no baço no sistema semi-Alo. Essa eliminação é mais impressionante nos linfonodos, levando-se em consideração que este é um local com alto percentual de células leucêmicas nos receptores controle negativo para a DECH (Sin e MO). Pode ser que isso seja devido ao fato de serem estes órgãos linfóides, onde a ativação de células T CD8⁺ anti-leucemia pode ser feita por células dendríticas, com auxílio da ativação de células T CD4⁺. Uma vez ativadas, estas células T CD8⁺ poderiam eliminar as células leucêmicas nestes órgãos. A participação de IFN- γ endógeno, produzido por células do hospedeiro remanescentes, também não pode ser descartada.

Também nos dois sistemas, alogeneico e semi-alogeneico, nos receptores de células T GKO é observada uma ausência completa de efeito ECL na MO, contrastando com a presença desse efeito no baço e LNs, como mencionado acima (**Figura 14 A e 18 A**). Como é observado um alto percentual de células leucêmicas na MO desse grupo nos sistemas semi-alogeneico e alogeneico, que apresentam diferentes magnitudes de efeito ECH, pode-se concluir que o ECL na MO é independente da magnitude do efeito ECH e completamente dependente da capacidade das células aloreativas de produzir IFN- γ . Isso indica uma completa separação desses efeitos com relação à MO. A MO é sítio de manutenção de micrometástases, que mantém as células em quiescência e protegidas de agressões potenciais, tornando-se um excelente habitat para células tumorais. Além disso, a interação com o estroma de MO é importante para manutenção de células leucêmicas com características de células tronco (Paraguassu-Braga, Borojevic *et al.*, 2003). Tudo indica, portanto, que as interações e o ambiente

gerado na presença de células leucêmicas na MO são bastante complexos, e a constatação de que a ausência de IFN- γ elimina completamente o efeito ECL neste local sugere uma distinção do ECL na MO dos outros locais, favorecendo a idéia de que os mecanismos do ECL, ou indutores, ou efetores, são diferentes na MO. Essas diferenças poderiam estar associadas a uma deficiência de migração de células T para esse local, a uma deficiência dessas células em quebrar possíveis barreiras imunossupressoras criadas pela leucemia (ou já existentes) na MO, ou ainda a uma apresentação de antígenos ineficiente nesse local. Células T estão normalmente presentes na MO e apresentam um fenótipo ativado, produzem citocinas e mantêm a hematopoiese normal (Monteiro, Benjamin *et al.*, 2005; Monteiro e Bonomo, 2005). Estão presentes também células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória (Di Rosa e Pabst, 2005; Mazo, Honczarenko *et al.*, 2005), e células T podem também ser primadas na própria MO (Feuerer, Beckhove *et al.*, 2003). Seria interessante determinar primariamente se existem números normais de células T na MO dos receptores de células T GKO, e se isso for verdade se essas células estão ativadas e se são capazes de eliminar células leucêmicas *in vitro* ou *in vivo*. Caso as células T na MO desses receptores não sejam efetivas na eliminação do tumor, pode-se pensar se a deficiência de produção de IFN- γ pelas células T infundidas perturba as relações normais dessas células com o ambiente da MO, ou se, uma vez que IFN- γ é importante na indução de aumento de expressão de moléculas de MHC, a apresentação de antígenos nesse local poderia estar comprometida. Se as funções normais de apresentação na MO continuam normais mas as células presentes na MO não são capazes de eliminar a leucemia, seria interessante avaliar a presença de mecanismos imunossupressores na MO colonizada

pela leucemia, e avaliar a função de células T Sv ou GKO em face desses possíveis mecanismos.

A principal diferença entre os sistemas semi-alogeneico e alogeneico é com relação ao fígado e ao sangue (**Figura 14 A e 18 A**). O sangue representa a rota seguida pelas células que circulam e, portanto, deveria representar a média dos tecidos. A ausência de células leucêmicas no sangue dos animais do grupo GKO no sistema alogeneico mesmo em face da presença de células leucêmicas na MO (**Figura 18 A**) reforça a idéia de que essas células presentes na MO não circulam, e sugere que as células GFP⁺ no sangue dos animais desse grupo no sistema semi-alogeneico reflete a presença das mesmas no fígado, nesse sistema. É observada a presença de efeito ECL completo no fígado dos animais do grupo GKO no sistema alogeneico (**Figura 18 A**), mas apenas um efeito parcial no sistema semi-alogeneico (**Figura 14 A**), o que sugere uma relação direta entre os efeitos ECL e ECH com relação ao fígado. Aqui cabe, portanto, uma melhor avaliação das diferenças no efeito ECH entre os sistemas semi-alogeneico e alogeneico, e entre os grupos receptores de células T Sv e GKO. Pode-se observar, pela comparação dos escores clínicos de DECH (**Figuras 14 B, 17 H e 18 B**), que o efeito ECH tem menor magnitude no sistema semi-alogeneico, mas que não há grande diferença com relação ao ECH entre os grupos Sv e GKO. Com relação às alterações patológicas no fígado, não há, quantitativamente, grandes diferenças entre os sistemas, mas parecem haver diferenças nos tipos de alteração encontradas, como pode ser observado comparando-se as **Figuras 15 J** (descrição na **tabela 5**) e **17 G** (descrição na **tabela 6**). Nos grupos Sv, nos dois sistemas, há acometimento principalmente dos espaços vasculares, e no grupo GKO há acometimento principalmente do parênquima hepático, sendo que as alterações parecem mais graves

no sistema alogeneico. Essa constatação, associada ao fato de um maior escore clínico de DECH no sistema alogeneico, sugere que a diferença no ECL encontrada no fígado do grupo GKO poderia ser relacionada à magnitude de uma resposta inflamatória ECH nesse órgão. O ambiente tumoral apresenta muitas vezes mecanismos imunossupressores, muitos deles mediados por citocinas anti-inflamatórias (Zou, 2005), e em face de uma resposta inflamatória mais alta talvez seja mais fácil romper esses mecanismos. No entanto é também interessante observar que mesmo na ausência de um efeito ECL eficiente no fígado do grupo GKO no sistema semi-alogeneico, há danos patológicos associados ao efeito ECH (**Figura 15 A e J**), o que sugere diferenças também nos mecanismos efetores entre o ECL e o ECH no fígado.

A **Figura 19** sumariza algumas das conclusões com relação ao papel do IFN- γ na resposta anti-leucemia nos sistemas semi-alogeneico e alogeneico.

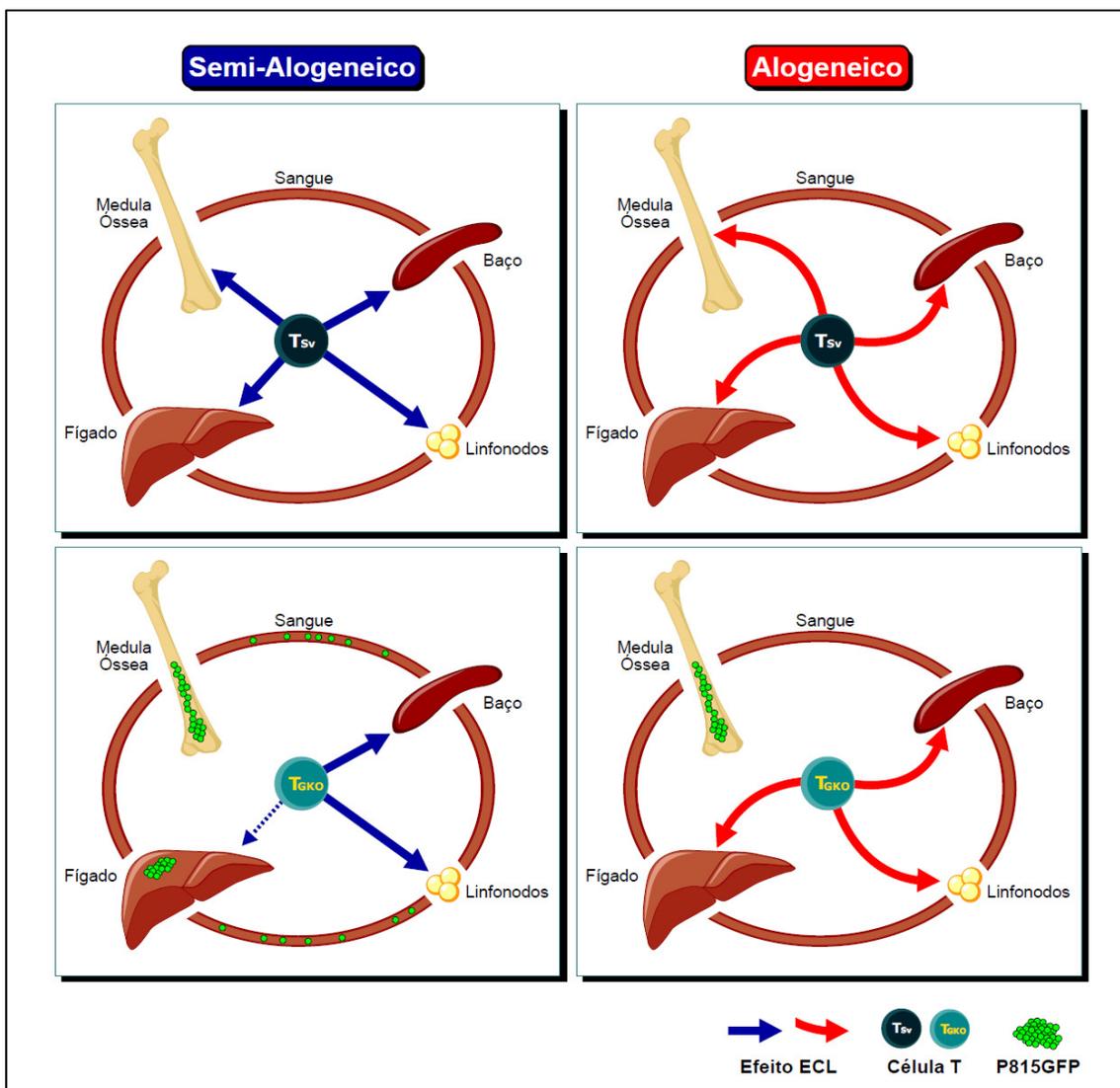


Figura 19. Papel do IFN- γ na resposta ECL associada à aDECH exp.: sistemas semi-alógenico e alógenico. Abreviações: Célula T Selvagem (TSv); Célula T IFN- γ KO (TGKO).

Foi verificado também se algumas das diferenças encontradas no ECL entre os grupos receptores de células T Sv ou GKO poderiam ser explicadas com relação ao perfil de produção de citocinas pelas células T do doador (**Figura 16 C**). Surpreendentemente, foi encontrado grande percentual de células T, tanto Sv como GKO, produzindo IL-17A nos órgãos linfóides secundários de animais receptores de leucemia e células T alógenicas, algo que não é observado na ausência de células leucêmicas (**Figura 13 M e N**). A maior diferenciação para o perfil Th17, no entanto,

seria insuficiente para explicar a ausência de efeito ECL na MO no grupo GKO, uma vez que é observada também nas células Sv (**Figura 16 C**). Contudo, são observadas células Sv produzindo apenas IFN- γ , e um importante percentual de células Sv, principalmente células T CD4⁺, produtoras de IFN- γ e IL-17A. Foi sugerido recentemente que essas células compreendem uma população inicialmente Th17, mas que atravessa uma conversão para Th1 (Lee, Turner *et al.*, 2009). A manutenção do fenótipo Th17 é dependente da sinalização constante de TGF- β , e na ausência desse fator uma conversão para o perfil Th1 é observada, sendo dependente de STAT-4 e T-bet (Lee, Turner *et al.*, 2009). Em modelo de melanoma, onde células T CD4⁺ específicas para antígenos tumorais são diferenciadas para Th1 ou Th17 *in vitro* e infundidas em receptores de tumor, células diferenciadas para Th17 eliminam tumor com eficiência consideravelmente superior a células Th1 (Muranski, Boni *et al.*, 2008). Foi mostrado que esse efeito anti-tumoral de células Th17 nesse modelo é dependente de IFN- γ e IL-17A, porém com uma importância mais pronunciada de IFN- γ , uma vez que a administração de anti-IL-17A mantém um efeito parcial e de anti-IFN- γ inibe completamente o efeito anti-tumoral (Muranski, Boni *et al.*, 2008). Se receptores GKO são utilizados, esse efeito de células Th17 é mantido, mas não se os receptores são deficientes para o receptor de IFN- γ , mostrando que o IFN- γ é produzido por essas células diferenciadas e que sua ação ocorre nos tecidos do receptor (Muranski, Boni *et al.*, 2008). IFN- γ induz aumento da expressão de moléculas de MHC em inúmeros tipos celulares (Boehm, Klamp *et al.*, 1997), e esse mecanismo poderia estar relacionado com seu papel na eliminação de tumores por células Th17. Assim, a produção de IFN- γ observada em células Sv na **Figura 16 C** poderia ser responsável pelo completo efeito ECL nos receptores dessas células. Entretanto, a eliminação de células leucêmicas é

observada em receptores de células GKO em outros locais mas não na MO (**Figura 18 A**). Se IFN- γ produzido por células do hospedeiro pode participar nesse efeito ECL visto fora da MO é algo que poderia ser determinado utilizando-se receptores e doadores GKO, ou com a administração de anticorpos anti-IFN- γ durante o transplante. Seria interessante também avaliar quais os mecanismos responsáveis por essa maior diferenciação para o perfil Th17 nos receptores de células leucêmicas, principalmente se a linhagem utilizada, P815, tem participação direta nesse mecanismo. Pode-se avaliar, por exemplo, se essa linhagem produz citocinas indutoras do perfil Th17, como TGF- β , e se essa diferenciação é também observada utilizando-se outras linhagens como modelo de leucemia. Outro ponto importante seria determinar se células T Sv diferenciadas para perfil Th1 ou Th17 realizam efeitos ECL diferentes, e qual o papel do IFN- γ se essas diferenças existirem.

Um ponto não discutido anteriormente foi o menor escore de patologia no cólon dos animais receptores de leucemia e células T GKO, com relação aos receptores de leucemia e células T Sv, observado nos sistemas semi-alogeneico (**Figura 15 A**) e alogeneico (**Figura 17 A**), mas não no sistema alogeneico sem leucemia (**Figura 13 B**). Uma possível relação entre a presença de leucemia e a redução nos danos patológicos no intestino no grupo GKO poderia ser com relação à maior diferenciação para o perfil Th17 observado nos receptores de células leucêmicas. Sabe-se que há uma relação das citocinas características desse perfil com a homeostase intestinal, principalmente de IL-22, uma citocina da família da IL-10 (Maloy e Kullberg, 2008). Se este for o caso, a redução nos danos apenas no grupo GKO poderia indicar que o IFN- γ , produzido por células T aloreativas, inibiria a ação protetora dessas citocinas e mediaría o dano intestinal.

Como conclusão, os dados apresentados neste trabalho mostram que uma avaliação mais precisa dos mecanismos envolvidos com os efeitos ECH e ECL depende de um modelo mais acurado, e apresentam novos fatos com relação aos mecanismos relacionados a esses efeitos. Como discutido, diversas melhorias em nosso modelo podem ser realizadas, como a avaliação de um número maior de citocinas, principalmente nos tecidos acometidos além dos órgãos linfóides secundários, e em diversos tempos; detecção do número de células leucêmicas por qPCR, que poderia reduzir as variações e permitir uma avaliação mais precoce dos efeitos; e a avaliação da produção de fatores que podem influenciar a resposta imune, como TGF- β , IL-6 e IL-1 β , nas células P815, além da utilização de outras linhagens celulares para eliminar influências de variações de modelo.

A possibilidade de diferenciar os efeitos ECH e ECL de maneira mais precisa abre novas portas para o desenvolvimento de tratamentos que inibam a DECH e permitam a ocorrência do efeito ECL. Para tanto, faz-se necessário identificar maneiras de separar os dois efeitos, algo que pode ser facilitado por uma melhor caracterização dos mecanismos responsáveis por cada um deles, tanto efetores como indutores, com identificação das sobreposições e exclusividades, se existentes, para então tentar eliminar as fontes de promoção do ECH e promover as fontes de realização do ECL.

6. CONCLUSÕES

- Fomos capazes de estabelecer um modelo quantitativo multiparamétrico de DECH aguda experimental, com avaliação de mortalidade, escore clínico e escore histopatológico;
- Fomos capazes de estabelecer um modelo quantitativo de resposta ECL;
- Nosso modelo é capaz de discriminar e quantificar os efeitos ECH e ECL;
- A ausência de IFN- γ causa uma DECH exacerbada, porém a mesma não pôde ser correlacionada à produção de IL-17A;
- O papel do IFN- γ na resposta anti-leucemia associada à DECH experimental variou de acordo com o local avaliado:
 - em Órgãos Linfóides Secundários, o efeito ECL ocorreu de maneira independente de IFN- γ ;
 - no Fígado, o ECL foi dependente de IFN- γ apenas quando o ECH era parcial;
 - na Medula Óssea, o ECL mostrou-se estritamente dependente de IFN- γ ;
- Na presença de leucemia, foi verificada uma significativa produção de IL-17A, independente de IFN- γ ;
- Na ausência de IFN- γ , receptores leucêmicos apresentaram menor patologia de cólon, com danos no fígado concentrados no parênquima.

7. BIBLIOGRAFIA

Antin, J. H., D. Weisdorf, *et al.* Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v.100, n.10, Nov 15, p.3479-82. 2002.

Appelbaum, F. R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. **Nature**, v.411, n.6835, May 17, p.385-9. 2001.

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

Asavaroengchai, W., H. Wang, *et al.* An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.13, n.1, Jan, p.46-55. 2007.

Awasthi, A., G. Murugaiyan, *et al.* Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. **J Clin Immunol**, v.28, n.6, Nov, p.660-70. 2008.

Badovinac, V. P., A. R. Tinnereim, *et al.* Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. **Science**, v.290, n.5495, Nov 17, p.1354-8. 2000.

Beilhack, A., S. Schulz, *et al.* Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. **Blood**, v.111, n.5, Mar 1, p.2919-28. 2008.

Beilhack, A., S. Schulz, *et al.* In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. **Blood**, v.106, n.3, Aug 1, p.1113-22. 2005.

Bleakley, M. e S. R. Riddell. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.5, May, p.371-80. 2004.

Boehm, U., T. Klamp, *et al.* Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v.15, p.749-95. 1997.

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, Dec 1, p.6451-9. 1993.

Brok, H. P., J. M. Vossen, *et al.* Interferon-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: development of immune competent and allo-tolerant T cells in chimeric mice. **Bone Marrow Transplant**, v.19, n.6, Mar, p.601-6. 1997.

Bromley, S. K., T. R. Mempel, *et al.* Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nat Immunol**, v.9, n.9, Sep, p.970-80. 2008.

Carlson, M. J., M. L. West, *et al.* In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. **Blood**, v.113, n.6, Feb 5, p.1365-74. 2009.

Cavet, J., A. M. Dickinson, *et al.* Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. **Blood**, v.98, n.5, Sep 1, p.1594-600. 2001.

Chu, C. Q., S. Wittmer, *et al.* Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v.192, n.1, Jul 3, p.123-8. 2000.

Clouthier, S. G., K. R. Cooke, *et al.* Repifermin (keratinocyte growth factor-2) reduces the severity of graft-versus-host disease while preserving a graft-versus-leukemia effect. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.9, n.9, Sep, p.592-603. 2003.

Cooke, K. R., A. Gerbitz, *et al.* LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. **J Clin Invest**, v.107, n.12, Jun, p.1581-9. 2001.

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, Oct 15, p.3230-9. 1996.

Dalton, D. K., L. Haynes, *et al.* Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J Exp Med**, v.192, n.1, Jul 3, p.117-22. 2000.

Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. **Science**, v.259, n.5102, Mar 19, p.1739-42. 1993.

De La Selle, V., N. Riche, *et al.* CD8+ cytotoxic T cell repertoire implicated in grafts-versus-leukemia effect in a murine bone marrow transplantation model. **Bone Marrow Transplant**, v.23, n.9, May, p.951-8. 1999.

De Marco Junior, P. e A. P. Paglia. Estatística e interpretação de dados. In: L. C. Junior, C. V. Padua, *et al.* (Ed.). **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: UFPR, 2003. Estatística e interpretação de dados

Deeg, H. J. Cytokines in graft-versus-host disease and the graft-versus-leukemia reaction. **Int J Hematol**, v.74, n.1, Jul, p.26-32. 2001.

Dey, B. R., Y. G. Yang, *et al.* Interleukin-12 inhibits graft-versus-host disease through an Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion. **Blood**, v.91, n.9, May 1, p.3315-22. 1998.

Di Rosa, F. e R. Pabst. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. **Trends Immunol**, v.26, n.7, Jul, p.360-6. 2005.

Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.5, May, p.337-48. 2008.

Duran-Struuck, R., I. Tawara, *et al.* A novel role for the semaphorin Sema4D in the induction of allo-responses. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.13, n.11, Nov, p.1294-1303. 2007.

Ellison, C. A., D. S. Bradley, *et al.* Murine graft-versus-host disease induced using interferon-gamma-deficient grafts features antibodies to double-stranded DNA, T helper 2-type cytokines and hypereosinophilia. **Immunology**, v.105, n.1, Jan, p.63-72. 2002.

Elmaagacli, A. H., M. Koldehoff, *et al.* Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. **Transplantation**, v.81, n.2, Jan 27, p.247-54. 2006.

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, Apr, p.371-5. 1986.

Feuerer, M., P. Beckhove, *et al.* Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. **Nat Med**, v.9, n.9, Sep, p.1151-7. 2003.

Gajewski, T. F., M. A. Markiewicz, *et al.* The p815 mastocytoma tumor model. **Curr Protoc Immunol**, v.Chapter 20, May, p.Unit 20 4. 2001.

Graubert, T. A., J. F. Dipersio, *et al.* Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. **J Clin Invest**, v.100, n.4, Aug 15, p.904-11. 1997.

Hakim, F., D. H. Fowler, *et al.* Animal models of acute and chronic graft-versus-host disease. **Curr Protoc Immunol**, v.Chapter 4, May, p.Unit 4 3. 2001.

Hill, G. R., K. R. Cooke, *et al.* Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **J Clin Invest**, v.102, n.1, Jul 1, p.115-23. 1998.

Hill, G. R., J. M. Crawford, *et al.* Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. **Blood**, v.90, n.8, Oct 15, p.3204-13. 1997.

Hill, G. R., T. Teshima, *et al.* Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. **J Clin Invest**, v.104, n.4, Aug, p.459-67. 1999.

Imado, T., T. Iwasaki, *et al.* Effect of FK506 on donor T-cell functions that are responsible for graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. **Transplantation**, v.77, n.3, Feb 15, p.391-8. 2004.

Kappel, L. W., G. L. Goldberg, *et al.* IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. **Blood**, v.113, n.4, Jan 22, p.945-52. 2009.

Khosrotehrani, K., K. L. Johnson, *et al.* Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. **J Reprod Immunol**, v.66, n.1, Jun, p.1-12. 2005.

Komiyama, Y., S. Nakae, *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v.177, n.1, Jul 1, p.566-73. 2006.

Krenger, W., K. M. Snyder, *et al.* Polarized type 2 alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. **J Immunol**, v.155, n.2, Jul 15, p.585-93. 1995.

Krijanovski, O. I., G. R. Hill, *et al.* Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. **Blood**, v.94, n.2, Jul 15, p.825-31. 1999.

Lee, Y. K., H. Turner, *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v.30, n.1, Jan, p.92-107. 2009.

Li, X., K. K. Mckinstry, *et al.* IFN-gamma acts directly on activated CD4⁺ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals. **J Immunol**, v.179, n.2, Jul 15, p.939-49. 2007.

Liem, L. M., H. C. Van Houwelingen, *et al.* Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation. **Transplantation**, v.66, n.7, Oct 15, p.863-71. 1998.

Liu, Y. e C. A. Janeway, Jr. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. **J Exp Med**, v.172, n.6, Dec 1, p.1735-9. 1990.

Maloy, K. J. e M. C. Kullberg. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. **Mucosal Immunol**, v.1, n.5, Sep, p.339-49. 2008.

Mauermann, N., J. Burian, *et al.* Interferon-gamma regulates idiopathic pneumonia syndrome, a Th17+CD4⁺ T-cell-mediated graft-versus-host disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.178, n.4, Aug 15, p.379-88. 2008.

Mazo, I. B., M. Honczarenko, *et al.* Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. **Immunity**, v.22, n.2, Feb, p.259-70. 2005.

Middleton, P. G., P. R. Taylor, *et al.* Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. **Blood**, v.92, n.10, Nov 15, p.3943-8. 1998.

Mills, K. H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **Eur J Immunol**, v.38, n.10, Oct, p.2636-49. 2008.

Min, C. K., W. Y. Lee, *et al.* The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v.28, n.10, Nov, p.935-40. 2001.

Monteiro, J. P., A. Benjamin, *et al.* Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4⁺ T cells. **Blood**, v.105, n.4, Feb 15, p.1484-91. 2005.

Monteiro, J. P. e A. Bonomo. Linking immunity and hematopoiesis by bone marrow T cell activity. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.10, Oct, p.1475-86. 2005.

Morecki, S., Y. Gelfand, *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, n.9, Sep, p.973-84. 2008.

Mowat, A. M. Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. **Immunology**, v.68, n.1, Sep, p.18-23. 1989.

Muranski, P., A. Boni, *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v.112, n.2, Jul 15, p.362-73. 2008.

Murphy, G. F., D. Whitaker, *et al.* Characterization of target injury of murine acute graft-versus-host disease directed to multiple minor histocompatibility antigens elicited by either CD4+ or CD8+ effector cells. **Am J Pathol**, v.138, n.4, Apr, p.983-90. 1991.

Murphy, W. J., L. A. Welniak, *et al.* Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. **J Clin Invest**, v.102, n.9, Nov 1, p.1742-8. 1998.

Nestel, F. P., K. S. Price, *et al.* Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. **J Exp Med**, v.175, n.2, Feb 1, p.405-13. 1992.

Nikolic, B., S. Lee, *et al.* Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. **J Clin Invest**, v.105, n.9, May, p.1289-98. 2000.

Novelli, F., P. Bernabei, *et al.* Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN-gamma is correlated with the differential expression of the alpha- and beta-chains of its receptor. **J Immunol**, v.157, n.5, Sep 1, p.1935-43. 1996.

Novelli, F., M. M. D'elios, *et al.* Expression and role in apoptosis of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor on human Th1 and Th2 clones. **J Immunol**, v.159, n.1, Jul 1, p.206-13. 1997.

Pan, L., T. Teshima, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic stem cell transplantation maintains graft-versus-leukemia effects through a perforin-dependent pathway while preventing graft-versus-host disease. **Blood**, v.93, n.12, Jun 15, p.4071-8. 1999.

Paraguassu-Braga, F. H., R. Borojevic, *et al.* Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. **Cell Death Differ**, v.10, n.9, Sep, p.1101-8. 2003.

Piguat, P. F., G. E. Grau, *et al.* Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. **J Exp Med**, v.166, n.5, Nov 1, p.1280-9. 1987.

Refaeli, Y., L. Van Parijs, *et al.* Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. **J Exp Med**, v.196, n.7, Oct 7, p.999-1005. 2002.

Remberger, M., M. Jaksch, *et al.* Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Haematol**, v.70, n.6, Jun, p.384-91. 2003.

Sakata, N., M. Yasui, *et al.* Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, v.27, n.11, Jun, p.1153-61. 2001.

Schmaltz, C., O. Alpdogan, *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, May 1, p.2886-95. 2001.

Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. **Science**, v.285, n.5426, Jul 16, p.412-5. 1999.

Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, *et al.* Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. **Nat Med**, v.14, n.3, Mar, p.337-42. 2008.

Stuber, E., P. Schlenger, *et al.* Interferon-gamma is not involved in the intestinal manifestations of the acute murine semiallogenic graft-versus-host disease. **Int J Colorectal Dis**, v.16, n.5, Sep, p.346-51. 2001.

Stummvoll, G. H., R. J. Dipaolo, *et al.* Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. **J Immunol**, v.181, n.3, Aug 1, p.1908-16. 2008.

Sun, K., L. A. Welniak, *et al.* Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.21, May 25, p.8120-5. 2004.

Sun, Y., I. Tawara, *et al.* Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. **Transl Res**, v.150, n.4, Oct, p.197-214. 2007.

Sykes, M., V. S. Abraham, *et al.* IL-2 reduces graft-versus-host disease and preserves a graft-versus-leukemia effect by selectively inhibiting CD4+ T cell activity. **J Immunol**, v.150, n.1, Jan 1, p.197-205. 1993.

Sykes, M., G. L. Szot, *et al.* Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. **Blood**, v.86, n.6, Sep 15, p.2429-38. 1995.

Takatsuka, H., Y. Takemoto, *et al.* Predicting the severity of graft-versus-host disease from interleukin-10 levels after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v.24, n.9, Nov, p.1005-7. 1999.

Tanaka, J., M. Imamura, *et al.* The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant**, v.19, n.6, Mar, p.571-6. 1997.

Teshima, T., G. R. Hill, *et al.* IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **J Clin Invest**, v.104, n.3, Aug, p.317-25. 1999.

Teshima, T., R. Ordemann, *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. **Nat Med**, v.8, n.6, Jun, p.575-81. 2002.

Tracey, K. J., H. Wei, *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. **J Exp Med**, v.167, n.3, Mar 1, p.1211-27. 1988.

Tsukada, N., T. Kobata, *et al.* Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v.93, n.8, Apr 15, p.2738-47. 1999.

Van Bekkum, D. W., J. Roodenburg, *et al.* Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. **J Natl Cancer Inst**, v.52, n.2, Feb, p.401-4. 1974.

Van Den Brink, M. R., E. Moore, *et al.* Fas-deficient lpr mice are more susceptible to graft-versus-host disease. **J Immunol**, v.164, n.1, Jan 1, p.469-80. 2000.

Van Kuppeveld, F. J., J. T. Van Der Logt, *et al.* Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Appl Environ Microbiol**, v.58, n.8, Aug, p.2606-15. 1992.

Vasconcelos, Z. F., B. M. Dos Santos, *et al.* G-CSF-treated granulocytes inhibit acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.107, n.5, Mar 1, p.2192-9. 2006.

Visentainer, J. E., S. R. Lieber, *et al.* Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. **Exp Hematol**, v.31, n.11, Nov, p.1044-50. 2003.

Vossen, J. M., P. J. Heidt, *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, n.1, Jan, p.14-23. 1990.

Wang, H., W. Asavaroengchai, *et al.* Paradoxical effects of IFN-gamma in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury. **Blood**, v.113, n.15, Apr 9, p.3612-9. 2009.

Wang, J., J. L. Shaw, *et al.* Down-regulation of antihost alloreactivity after bone marrow transplant permits relapse of hematological malignancy. **Cancer Res**, v.62, n.1, Jan 1, p.208-12. 2002.

Welniak, L. A., B. R. Blazar, *et al.* Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.6, n.6, p.604-12. 2000.

Welniak, L. A., B. R. Blazar, *et al.* Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Annu Rev Immunol**, v.25, p.139-70. 2007.

Wysocki, C. A., A. Panoskaltis-Mortari, *et al.* Leukocyte migration and graft-versus-host disease. **Blood**, v.105, n.11, Jun 1, p.4191-9. 2005.

Xaus, J., M. Cardo, *et al.* Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. **Immunity**, v.11, n.1, Jul, p.103-13. 1999.

Yang, Y. G., B. R. Dey, *et al.* Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. **J Clin Invest**, v.102, n.12, Dec 15, p.2126-35. 1998.

Yang, Y. G., J. Qi, *et al.* Donor-derived interferon gamma separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. **Blood**, v.99, n.11, Jun 1, p.4207-15. 2002.

Yang, Y. G., J. J. Sergio, *et al.* Interleukin-12 preserves the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-versus-host disease in mice. **Blood**, v.90, n.11, Dec 1, p.4651-60. 1997.

Yi, T., D. Zhao, *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.112, n.5, Sep 1, p.2101-10. 2008.

Zeiser, R., V. H. Nguyen, *et al.* Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. **Blood**, v.108, n.1, Jul 1, p.390-9. 2006.

Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.4, Apr, p.263-74. 2005.

8.FIGURAS SUPLEMENTARES

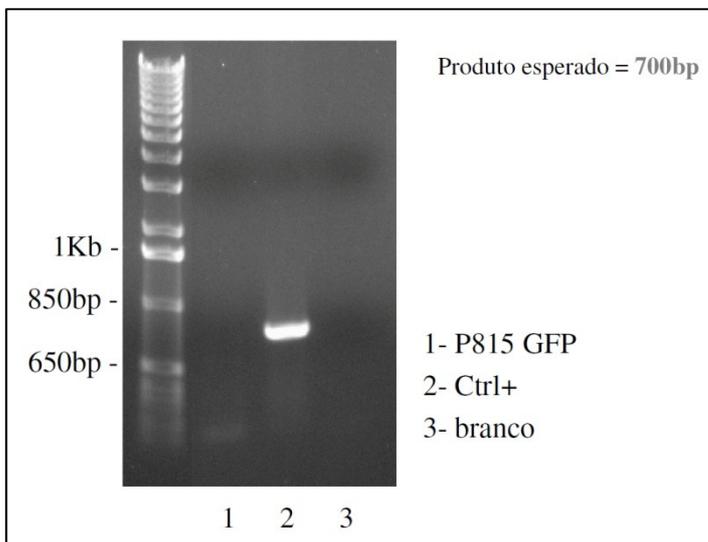


Figura Suplementar 1. PCR para detecção de micoplasma. DNA foi extraído de células P815GFP e a presença de micoplasma verificada utilizando-se primers para o gene codificante de rRNA 16S. O produto esperado da reação é de 700bp. Controle positivo (Ctrl+): células com característica de contaminação por micoplasma (crescimento ruim em cultura, presença de debris no meio) tiveram DNA extraído e foram descartadas em um momento anterior, sendo este DNA considerado positivo para presença de micoplasma por PCR o mesmo foi usado como controle positivo da reação. Branco: água.

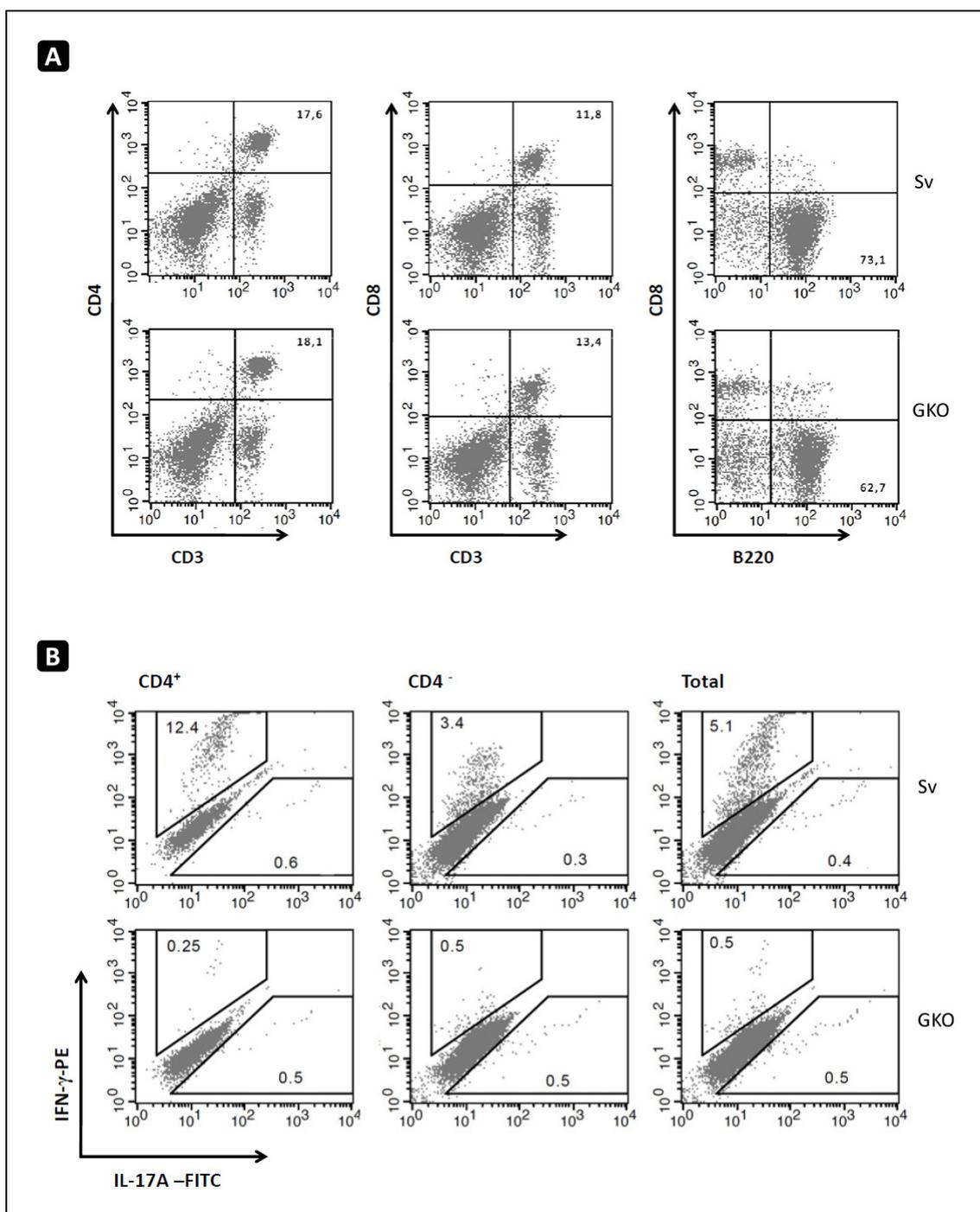


Figura Suplementar 2. Fenotipagem dos animais GKO. **A)** Células esplênicas de animais B6 (Sv) e GKO foram marcadas com anticorpos para determinar a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B. **B)** Células de linfonodo mesentérico de animais B6 e GKO foram ativadas por 36 horas com ConA e a produção de IFN- γ e IL-17A determinada por marcação intracitoplasmática. Agrupamento de dois animais em **A** e **B**.

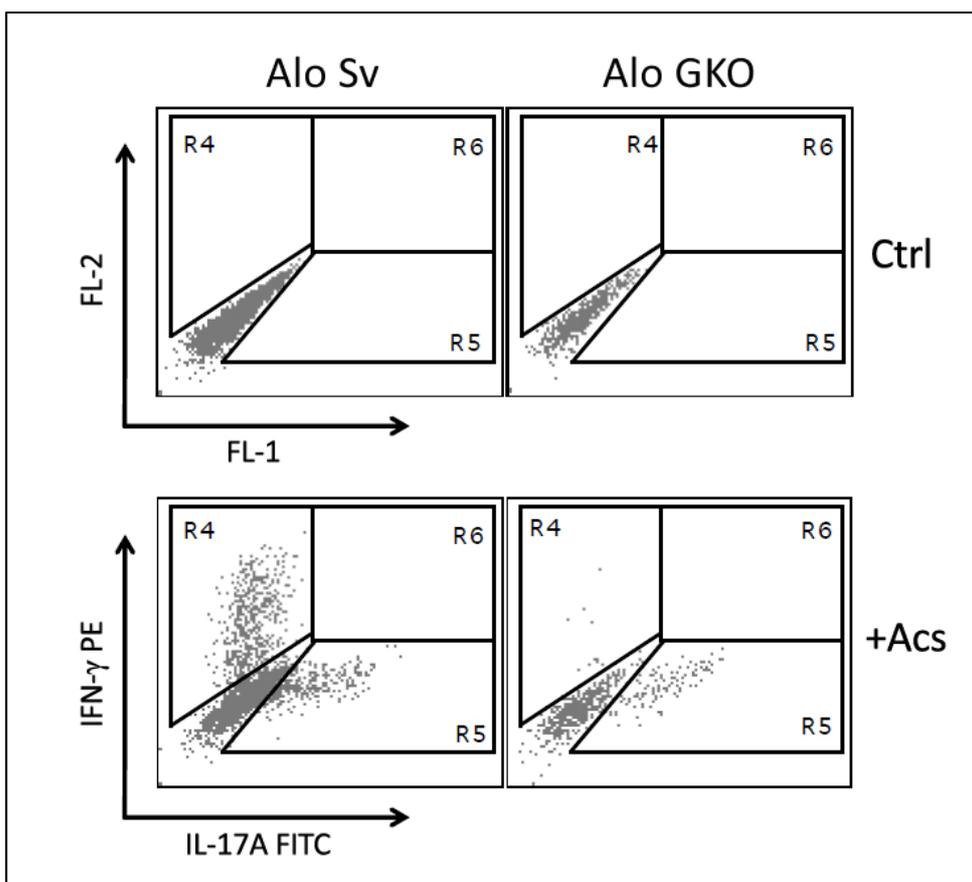


Figura Suplementar 3. Separação das células positivas e negativas para IFN- γ e IL-17A nos experimentos da **Figura 13** após marcação intracitoplasmática foi feita por comparação utilizando-se tubos não marcados para essas citocinas (Ctrl) e tubos com adição de anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-17A (+Acs).

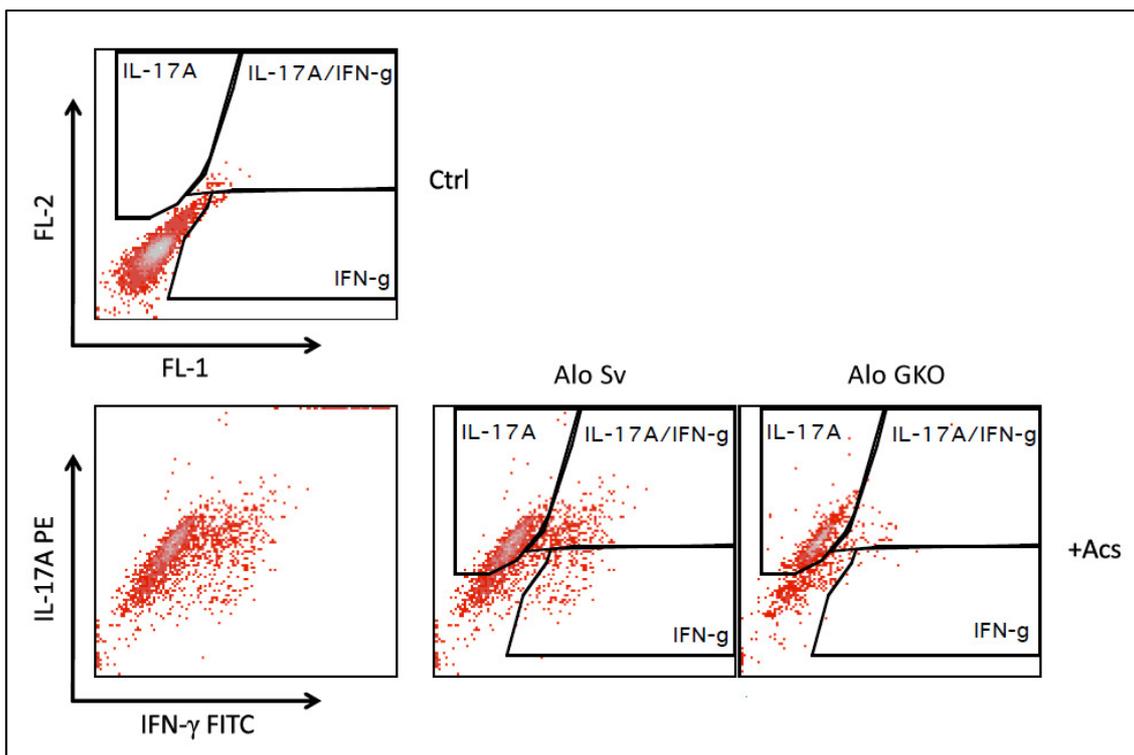


Figura Suplementar 4. Separação das células positivas e negativas para IFN- γ e IL-17A nos experimentos da **Figura 16** após marcação intracitoplasmática foi feita por comparação utilizando-se tubos não marcados para essas citocinas (Ctrl) e tubos com adição de anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-17A (+Acs).

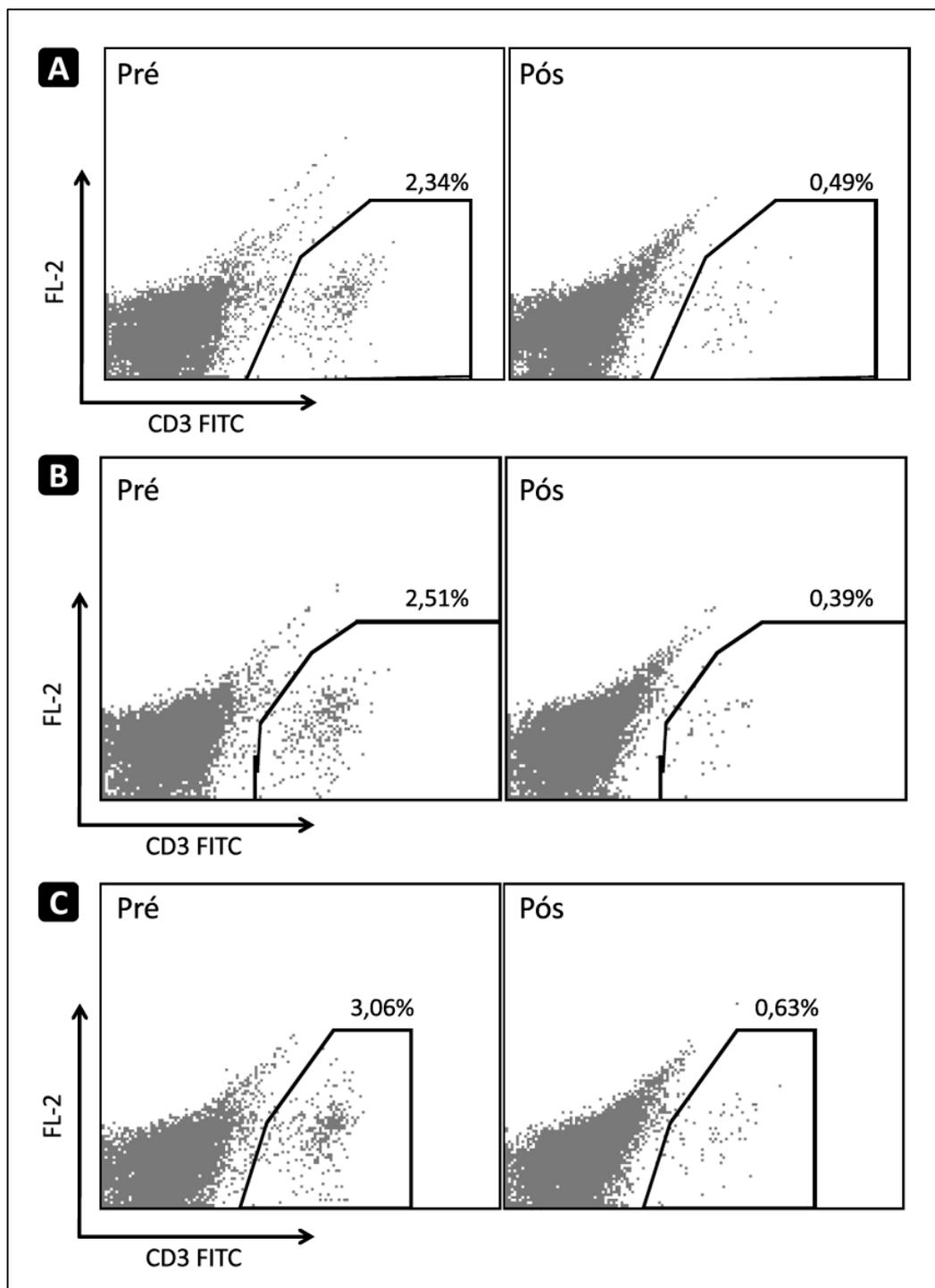


Figura Suplementar 5. Depleção de células T por complemento. Células T foram depletadas da Mo de B6 com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e complemento de coelho. O percentual de células CD3+ antes (Pré) e após (Pós) a depleção é mostrado para os experimentos das seguintes figuras: **A) Figura 14 B) Figura 16 C) Figura 18.**