UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LUCAS COELHO MARLIÈRE ARRUDA

**Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de
células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose
sistêmica**

Ribeirão Preto

2017

LUCAS COELHO MARLIÈRE ARRUDA

Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose sistêmica

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Arruda, Lucas Coelho Marlière

Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose sistêmica. Ribeirão Preto, 2017.

93 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Rodrigues, Maria Carolina de Oliveira

Co-orientadora: Malmegrim, Kelen Cristina Ribeiro

1. Autoimunidade 2. Esclerose sistêmica 3. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas
4. Reconstituição imunológica.

Essa tese recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 13/18678-3 e 14/20922-2, compondo o Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) "Centro de Terapia Celular" (CTC) processo 13/08135-2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Coelho Marlière Arruda

Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose sistêmica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Carolina de Oliveira
Rodrigues

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro
Malmegrim

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(^a). Dr(^a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(^a). Dr(^a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(^a). Dr(^a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(^a). Dr(^a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(^a). Dr(^a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu saudoso pai, Wâner, em sua memória

À minha amada mãe, Nilza, com eterna gratidão

À Clarice e Luana, com carinho

À memória do Professor Júlio César Voltarelli

Aos pacientes

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas;

Aos meus Pais, anjos da minha vida, Wâner e Nilza, pelo incentivo, dedicação e exemplo. À minha irmã, Clarice, pelo carinho. Sem vocês nada disso seria possível, todo o esforço, confiança e entendimento foram fundamentais. À Luana pelo carinho e companheirismo. Aos meus tios, primos e familiares;

Às Professoras Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias e Maria Carolina de Oliveira Rodrigues pela oportunidade, confiança e aprendizados. Ao Professor Júlio César Voltarelli (*In memoriam*). Muito obrigado por tudo;

À diretoria científica e administrativa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e seus funcionários, em cujos laboratórios esse trabalho foi desenvolvido. Em especial ao laboratório de Citometria de Fluxo e seus funcionários;

Aos Professores Antoine Toubert e Dominique Farge e a todos os funcionários do *Institut Universitaire d'Hématologie e Hôpital Saint Louis* pela simpatia e oportunidade;

À Universidade de São Paulo e ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pelo ensino público de qualidade e vanguarda científica;

À Finep, CNPq e FAPESP (processos: 13/08135-2, 13/18678-3 e 14/20922-2) pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização desse projeto;

À unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas e aos funcionários responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes e coleta das amostras;

Aos pacientes transplantados, pela confiança na realização desse projeto;

Aos amigos do Laboratório de Cultura Celular pelo apoio, paciência e amizade: Juliana Ueda, Carolina Caliari, Júlia Teixeira de Azevedo, João Rodrigues, Kalil Alves de Lima, Mariana Davanso, Luciana Jardulli, Luciano Costa, Robson Amaral, Rafael Biaggio, Amanda Mizukami, Mario Soares Neto, Lucas Catelli e Monize Decarli. Em especial à Rosane Bolzoni, Ana Júlia Machry e Maria Isabel da Mata pelo apoio técnico;

Aos meus amigos de moradia e de pós-graduação durante essa caminhada, pela diversão, companheirismo e descontração, em especial ao Mario Soares Neto, Maria Cláudia, Germano Reis, Omar Martinez, Matheus Zanela, Rafael Prado, Ronivaldo Rodrigues, Tiago Medina, Julian Gonçalves, Leandro Lofeu, Sílvio Yuji, Giovanne Mendes, Jonas Mangabeira e Diego Venturelli. À toda “turma da pelada”, aos meus amigos "de som" e "de copo";

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma pela realização dessa tese e pela minha formação acadêmica, meu MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

Máximas do Visconde de Tanajura¹

"A palavra que nos pertence, é justamente a que não emitimos"

"Se beberes do Evangelho, nunca mais terás sede"

"O defeito que vejo no próximo, esse eu possuo"

"Esperanto - La estonta lingvo en la estanto"

"Não é pela altura que se mede um homem, mas pelo seu caráter"

"O importante não é vencer no mundo, e sim, vencer o mundo"

"Melhor errar tentando acertar, que temer o fracasso"

"Lendo, irás adquirir ideias e ideais"

"Consciência nublada pesa mais que chumbo"

"O caminho reto, por ser o mais certo, é também o mais duro"

(Autor: Visconde de Tanajura)

¹Visconde de Tanajura é o pseudônimo de Wâner Marlière Arruda (*In memoriam*), membro da Academia Ubaense de Letras, Cadeira nº 22 "João Ernesto", Comendador pela cidade de Guidoal-MG e engenheiro da Prefeitura Municipal de Ubá-MG, para o qual se dedica essa tese.

RESUMO

ARRUDA, L.C.M. **Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose sistêmica.** 2017. 93 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) tem se mostrado mais eficaz como tratamento das formas graves da esclerose sistêmica (ES) do que a imunossupressão convencional (IS), porém os mecanismos imunológicos envolvidos com a resposta terapêutica não estão completamente elucidados. Células mononucleares do sangue periférico e soro/plasma foram coletados de 31 pacientes com ES antes e semestralmente, até 36 meses pós-transplante, e de 16 pacientes com ES não-transplantados tratados com IS. A função tímica foi avaliada por RT-qPCR dos valores de β - e *signal joint* (sj)-*T-cell receptor excision circles* (TREC), sendo a taxa de proliferação intratímica (n) calculada pela fórmula: $n = \text{LOG}(\text{sjTREC}/\beta\text{TREC})/\text{LOG}2$. A história replicativa das células B e a função medular foram quantificadas pelos valores de *coding-joint* (Cj) e *sj-kappa-deleting recombination excision circles* (sjKREC) e a taxa de proliferação das células B no sangue periférico (N) foi calculada pela fórmula: $N = \text{LOG}(\text{Cj}/\text{sjKREC})/\text{LOG}2$. O comprimento telomérico foi avaliado por RT-qPCR e estimado pela razão T/S (*Telomere repeat copy number/Single-copy gene copy number*). As células recém-emigradas do timo (RET) $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}31^+\text{CD}45\text{RA}^+$, T reguladoras (Tregs) $\text{CD}4^+\text{CD}25^{\text{hi}}\text{FoxP}3^+(\text{GITR}^+/\text{CTLA}-4^+)$, *naïve* $\text{CD}19^+\text{CD}27^-\text{IgD}^+$, Bm2 $\text{CD}19^+\text{CD}38^{\text{low}}\text{IgD}^+$, B reguladoras (Bregs) $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}$, senescentes $\text{CD}8^+\text{CD}28^-\text{CD}57^+$ e exaustas $\text{PD}1^+$ foram quantificadas por citometria de fluxo. O TCR foi sequenciado por sequenciamento de nova geração e o perfil de citocinas séricas inflamatórias e pró-fibróticas foi avaliado por CBA-Flex e ELISA. Observamos que os valores de sjTREC e β TREC diminuíram aos 6 meses pós-TACTH, retornando a valores basais aos 12 meses, correlacionando com o número de RET e promovendo maior diversidade do TCR. Não houve mudança na taxa de divisão de timócitos. A contagem de Tregs aumentou aos 12 meses pós-TACTH, correlacionando com valores de sjTREC e apresentando maior expressão de GITR e CTLA-4. A partir dos 12 meses, até o final do acompanhamento, os valores de sjKREC aumentaram, enquanto que os de Cj permaneceram estáveis, correlacionando com aumento da contagem de células B *naïve* e Bm2, e resultando em uma menor taxa de divisão de células B.

Houve aumento de Bregs de 6 meses a um ano após o TACTH, cujos níveis correlacionaram-se com aqueles de sjKREC, e apresentando maior produção de IL-10 mediante estímulo com CPG±CD40L do que antes do transplante. O comprimento telomérico diminuiu aos 6 meses pós-TACTH e correlacionou-se com níveis elevados de células senescentes que expressavam FoxP3, aliado a um aumento de expressão de PD1 pelas células T e redução dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β e proteína C reativa. Seis pacientes recaíram após o transplante, apresentando menor expressão de FoxP3, GITR e CTLA-4 pelas Tregs, diminuição da contagem de Breg e da diversidade do TCR. Adicionalmente, a remissão clínica foi associada a maior expressão de PD1 por células T e B e baixos níveis séricos de TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-17A, MIP-1 α , G-CSF e IL-12. Portanto, o aumento de células T e B reguladoras geradas *de novo* pós-TACTH, associado à renovação do repertório de células T, alta expressão de PD1 e baixos níveis séricos de mediadores inflamatórios e prófibróticos, estão relacionadas com a resposta clínica dos pacientes com ES ao transplante.

Palavras-chave: Autoimunidade. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. Esclerose sistêmica. Reconstituição imunológica. Terapia celular.

ABSTRACT

ARRUDA, L.C.M. **Evaluation of immunological mechanisms associated with autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients.** 2017. 93 p. Doctoral thesis. Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is more effective for patients with severe systemic sclerosis (SSc) than conventional immunosuppression (IS). However, the immunological mechanisms associated with the therapeutic efficacy of AHSCT are not fully elucidated. Peripheral blood mononuclear cells and serum/plasma were collected from 31 SSc patients before and semiannually, until 36 months post-transplant, and from 16 non-transplanted SSc patients treated with IS. Thymic function was measured by RT-qPCR quantification of β - and signal joint (sj)-T-cell receptor excision circles (sjTREC) and intra-thymic T-cell division (n) was calculated by the formula: $n = \text{LOG}(\text{sjTREC}/\beta\text{TREC})/\text{LOG}2$. B-cell replication history and bone marrow function were assessed by coding-joint (Cj) and sj-kappa-deleting recombination excision circles (sjKREC). B-cell divisions in the peripheral blood (N) were calculated by the formula: $N = \text{LOG}(\text{Cj}/\text{sjKREC})/\text{LOG}2$. $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}31^+\text{CD}45\text{RA}^+$ recent thymic emigrants (RTE), $\text{CD}4^+\text{CD}25^{\text{hi}}\text{FoxP}3^+$ (GITR⁺/CTLA-4⁺) regulatory T-cells (Tregs), $\text{CD}19^+\text{CD}27\text{IgD}^+$ naïve B-cells, $\text{CD}19^+\text{CD}38^{\text{low}}\text{IgD}^+$ Bm2 B-cells, $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}$ regulatory B-cells (Bregs), $\text{CD}8^+\text{CD}28^-\text{CD}57^+$ senescent cells and $\text{PD}1^+$ exhausted cells were quantified by FACS (fluorescence-activated cell sorting). The T-cell receptor (TCR) was sequenced by New Generation Sequencing and the profile of inflammatory and pro-fibrotic serum cytokines was evaluated by CBA-Flex (cytometric bead-array) and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). sjTREC and β TREC values decreased at 6 months post-AHSCT, returning to pre-transplant values at 12 months, correlating with RTE counts and associated with higher diversity of the TCR. There was no change in thymocyte division rates. At 12 months post-AHSCT, Treg counts increased and correlated with sjTREC values, presenting increased expression of GITR and CTLA-4 when compared to pre-transplant levels. From 12 months until the end of follow-up, sjKREC values increased, while those of Cj remained stable, correlating with increased counts of naïve and Bm2 B-cells, resulting in reduced rate of B-cell division. There was an increase of Breg frequency from 6-months until one-year after AHSCT, correlating with sjKREC values and presenting higher IL-10 production after

stimulation with CPG±CD40L than before transplantation. Telomere length decreased at 6 months post-transplant and correlated with elevated levels of FoxP3-expressing senescent cells, together with increased expression of PD1 by T-cells and reduced serum IL-6, IL-1 β and C-reactive protein levels. Six patients relapsed after transplantation, presenting lower expression of FoxP3, GITR, CTLA-4 by Tregs, decreased Breg counts and reduced TCR diversity. In addition, clinical remission was associated with increased PD1 expression by T and B cells and low serum levels of TGF- β , IL-6, IL-1, IL-17A, MIP-1, G-CSF and IL-12. Therefore, newly-generated regulatory T and B cells after AHSCT, associated with T-cell repertoire renewal, high PD1 expression and low serum levels of inflammatory and pro-fibrotic mediators associate with clinical outcomes of SSc patients after AHSCT.

Keywords: Autoimmunity. Autologous hematopoietic stem cell transplantation. Systemic sclerosis. Immune reconstitution. Cell therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA	21
2.2 TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS PARA ESCLEROSE SISTÊMICA	26
2.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	31
3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	41
4 OBJETIVOS.....	43
4.1 OBJETIVO GERAL	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 RESULTADOS	45
5.1 MANUSCRITO 1: <i>AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION FOR AUTOIMMUNE DISEASES: SPECIFIC DISEASES AND CONTROVERSIES</i>	45
5.2 MANUSCRITO 2: <i>RESETTING THE IMMUNE RESPONSE AFTER AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION FOR AUTOIMMUNE DISEASES</i>	46
5.3 MANUSCRITO 3: RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA APÓS TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES	47
5.4 MANUSCRITO 4: <i>IMMUNE REBOUND ASSOCIATES WITH A FAVORABLE CLINICAL RESPONSE TO AUTOLOGOUS HSCT IN SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS</i>	48
5.5 MANUSCRITO 5: <i>HOMEOSTATIC PROLIFERATION LEADS TO TELOMERE ATTRITION AND INCREASED PD-1 EXPRESSION AFTER AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC SCT FOR SYSTEMIC SCLEROSIS</i>	49
5.6 MANUSCRITO 6: <i>EVOLUTION OF SERUM CYTOKINE PROFILE AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS</i>	50
5.7 MANUSCRITO 7: <i>LONG-TERM IMMUNE RECONSTITUTION AND T-CELL REPERTOIRE ANALYSIS AFTER AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS</i>	51
6 DISCUSSÃO.....	53
7 SUMÁRIO	62
8 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO A- LISTA DE PUBLICAÇÕES	78
ANEXO B- PRÊMIOS ASSOCIADOS A ESSA TESE	80
ANEXO C- REPERCUSSÃO DESSE TRABALHO	81
REIMPRESSÕES DOS MANUSCRITOS	

PRÓLOGO

A presente tese objetiva apresentar os resultados da pesquisa intitulada “Estudo dos mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com esclerose sistêmica”, desenvolvida no âmbito do CEPID-FAPESP "Centro de Terapia Celular", com produção de sete manuscritos. No contexto da terapia celular para doenças autoimunes, mais especificamente no uso do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas para a esclerose sistêmica, discutimos seus conceitos e controvérsias, eficácia, riscos e manejo terapêutico, além de elucidar possíveis mecanismos imunológicos relacionados à resposta terapêutica observada após transplante.

O primeiro manuscrito intitula-se: *Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplants for Autoimmune Diseases: Specific Diseases and Controversies*. Foi publicado pela Cambridge University Press como capítulo 57 do livro *Hematopoietic Cell Transplants: Concepts, Controversies and Future Directions*, editado pelo Dr. Hillard M. Lazarus. Nesse trabalho, realizamos aprofundada discussão a respeito das controvérsias relacionadas ao transplante, dissertando sobre a resposta clínica nas diferentes doenças autoimunes, critérios de inclusão e exclusão, regimes de condicionamento, mobilização e manipulação do enxerto, bem assim como seus efeitos colaterais. Uma seção deste capítulo trata especificamente dos mecanismos imunológicos associados ao transplante de células-tronco hematopoéticas para doenças autoimunes.

No segundo manuscrito, *Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases*, estão revisados os principais mecanismos imunológicos relacionados à eficácia terapêutica do transplante, publicado no periódico *Current Research in Translational Medicine*, em 2016. A revisão discute resultados dos principais estudos que investigaram a eficácia do transplante em depletar as células autorreativas e a conseqüente formação *de novo* de um sistema imunológico autotolerante e diverso pelo mecanismo de *resetting* imunológico.

O terceiro manuscrito é intitulado "Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com doenças autoimunes" e discute os aspectos básicos da reconstituição imunológica após transplante e os mecanismos imunológicos envolvidos na sua resposta terapêutica. O mesmo irá compor o livro "Terapia celular na Doença de Crohn", editado pelo Prof. Dr. Milton Ruiz e Dr. Roberto Kayser.

O quarto e principal manuscrito, *Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients*, reporta os achados mais

importantes dessa tese. Nele descrevemos os processos de reativação da função tímica e medular (medula óssea) após o transplante, sua influência na geração de um sistema imunológico mais diverso e menos autorreativo através da maior ontogenia de células T e B *naïves*, assim como sua importância na geração *de novo* de células T e B reguladoras. Adicionalmente, descreve a influência das células T residuais, que sobreviveram ao transplante, sobre a resposta clínica.

O quinto manuscrito: *Homeostatic proliferation leads to telomere attrition and increased PD-1 expression after autologous hematopoietic SCT for systemic sclerosis*, descreve as principais mudanças imunológicas desencadeadas nos períodos iniciais após transplante que precedem a reativação da função tímica, e suas implicações clínicas, focando no papel da proliferação homeostática e atrição telomérica na resposta terapêutica alcançada após transplante.

O quinto manuscrito, *Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients*, descreve a avaliação dos níveis séricos de diversas citocinas e quimiocinas de pacientes com esclerose sistêmica após transplante e seu significado clínico, tendo sido publicado na revista *Bone Marrow Transplantation*, em 2016.

Finalizando, o sétimo artigo, intitulado *Long-term immune reconstitution and T cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients*, analisa a reconstituição imunológica após transplante nos pacientes com esclerose sistêmica durante longo período de seguimento, mostrando as alterações no sistema imunológico que podem estar relacionadas com a resposta terapêutica. Publicado no periódico *Journal of Hematology & Oncology*, em 2017.

A discussão é apresentada em cada manuscrito de forma subsequencial, adicionalmente, há uma discussão geral, abordando as contribuições desse trabalho no tópico **seis**. O sumário, resumindo as principais contribuições dessa tese, pode ser encontrado no tópico **sete**, e as conclusões finais, no tópico **oito**. As referências bibliográficas estão inseridas sequencialmente ao final de cada um dos manuscritos, e após as conclusões finais. Embora dupliquem algumas das citações específicas de cada manuscrito, facilitam a localização das referências citadas ao longo dos demais tópicos deste documento. Os anexos aparecem no final deste documento.

Nenhum dos trabalhos aqui descritos ou reproduzidos compuseram ou irão compor qualquer outra tese ou dissertação, compreendendo reproduções originais e inéditas dos mesmos com a autorização dos respectivos autores e colaboradores.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma complexa doença autoimune caracterizada pela tríade patogênica de dano microvascular, desregulação do sistema imune inato e adaptativo, e fibrose da pele e múltiplos órgãos (DENTON; KHANNA, 2017; GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009). O mecanismo patológico da doença é desencadeado por fatores ambientais (*e.g.* infecções, gestação, exposições ocupacionais), que atuando em indivíduos geneticamente suscetíveis, inicia um processo multifocal crônico e auto-amplificador de ativação descontrolada do sistema imunológico e consequente produção de autoanticorpos (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). Embora o espessamento cutâneo seja a principal característica clínica da doença, o processo de fibrose tecidual pode levar à disfunção dos órgãos internos, que comumente manifesta-se como dificuldade respiratória (fibrose pulmonar), alterações da motilidade gastrointestinal e má absorção (fibrose do trato digestivo), manifestações vasculares (úlceras isquêmicas digitais, acometimento das artérias renais e hipertensão pulmonar) e/ou função cardíaca diminuída (fibrose do endocárdio, miocárdio e pericárdio). Embora menos prevalente do que outras doenças reumáticas, a ES possui uma das mais altas taxas de mortalidade, variando de 22.1% em 5 anos após diagnóstico a 73.2% em 20 anos após diagnóstico (MAYES et al., 2003).

O tratamento da ES é dificultado por se tratar de doença sistêmica, pleomórfica, multifatorial e de etiologia pouco conhecida, sendo baseado na extensão e gravidade das lesões e exigindo principalmente estratégias órgão-específicas, como o uso de metotrexato e micofenolato mofetil (medicações imunorreguladoras) no tratamento da pele esclerodérmica, ou de pulsos mensais de ciclofosfamida (imunossupressor) e corticoides no tratamento do acometimento pulmonar (KOWAL-BIELECKA et al., 2009; NAGARAJA; DENTON; KHANNA, 2015). Apesar do manejo terapêutico órgão-específico ser eficiente no controle das manifestações clínicas da doença, na maioria dos casos os pacientes não respondem às terapias convencionais e a mortalidade pode chegar a 50% em cinco anos, a depender principalmente do grau de acometimento visceral (RANQUE; MOUTHON, 2009).

Portanto, os tratamentos atuais disponíveis para ES são insatisfatórios e ineficazes no controle da progressão da doença. Não se conhece, ainda, terapêutica realmente capaz de interferir na evolução natural da doença e os tratamentos de suporte empregados são de natureza paliativa e dirigidos a minorar efeitos de lesões já estabelecidas, não sendo portando curativos. Nesse contexto, o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) tem sido alternativa terapêutica efetiva para o tratamento da ES progressiva, grave e refratária

aos tratamentos convencionais (FARGE et al., 2010; SULLIVAN et al., 2016; VAN LAAR et al., 2014).

O TACTH envolve a administração de células-tronco hematopoéticas (CTHs) autólogas, mobilizadas previamente da medula óssea do paciente para o sangue periférico. Essas células possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em todos os tipos celulares maduros do sistema hematopoético e imunológico. O paciente é preparado para o transplante por tratamento prévio com imunossupressores em altas doses, seguido pela infusão de CTHs autólogas para a reconstituição dos sistemas hematopoético e imunológico (LI; SYKES, 2012; SYKES; NIKOLIC, 2005).

Os pacientes com ES considerados candidatos ao TACTH possuem progressão rápida da doença, incluindo significativo agravamento dos sintomas de pele e problemas renais e/ou pulmonares. O projeto brasileiro de TACTH para ES iniciou-se no Hospital das Clínicas da FMRP-USP em setembro de 2001, incluindo até hoje 84 pacientes e tem revelado resultados terapêuticos promissores. A maioria dos pacientes transplantados apresentou resposta clínica, com melhora do espessamento cutâneo e, pelo menos, estabilização da função pulmonar (BURT et al., 2013), corroborando dados da literatura internacional (DEL PAPA et al., 2016; FARGE et al., 2010; VAN LAAR et al., 2014). Além disso, considerando-se que os casos graves de ES apresentam altas taxas de morbimortalidade, o TACTH mostrou-se alternativa terapêutica relativamente segura, com aproximadamente 6% de morte relacionada ao tratamento. Portanto, o TACTH poderá ser futuramente adotado como a terapêutica-padrão para formas graves e progressivas da ES.

Embora o aperfeiçoamento do manejo clínico e a seleção mais criteriosa de pacientes tenham melhorado os desfechos clínicos do transplante para ES (SNOWDEN et al., 2012), os mecanismos imunológicos de ação dessa terapia ainda não estão completamente esclarecidos. O racional para o uso do TACTH no tratamento da ES é que a imunossupressão intensa eliminaria o repertório de células T e B autorreativas pré-existentes, e que o TACTH permitiria a reconstituição de um sistema imune novo, a partir dos precursores hematopoéticos, gerando novos linfócitos T e B autotolerantes após o transplante, assim promovendo a reeducação do sistema imune ou *immune resetting* (ALEXANDER et al., 2016).

Nesse contexto, observou-se que a remissão clínica apresentada pelos pacientes com esclerose múltipla (EM) após o TACTH não era decorrente somente do efeito imunossupressor intenso alcançado pela quimioterapia, mas de profundas mudanças qualitativas no sistema imunológico, demonstrando renovação do repertório de células T

(MURARO et al., 2005, 2014). Os pacientes que responderam à terapia apresentaram diversidade clonal mais ampla do repertório dos receptores das células T (TCR, do inglês *T-cell receptor*), além de renovação das especificidades clonais comparadas com o período pré-transplante, decorrente da produção de novas células T *naïve* pelo timo. O mesmo foi observado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), aliado à intensa ablação de células autoimunes (ALEXANDER et al., 2009). Em contrapartida, pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) não apresentaram aumentada diversidade clonal após transplante, e a resposta terapêutica se mostrou intimamente ligada à permanência de células T CD8⁺ autorreativas que deixaram de ser depletadas na etapa de condicionamento ou que foram reinfundidas com o enxerto (MALMEGRIM et al., 2017). Portanto, os mecanismos imunológicos relacionados ao desfecho clínico podem ser doença-específicos e devem ser avaliados individualmente.

Ainda não está claro se as células T e B de memória são completamente removidas do sistema hematopoético e linfóide e de órgãos-alvo, portanto, a imunoablação incompleta pode ser responsável pelas reativações precoces observadas em alguns ensaios clínicos de TACTH (FARGE et al., 2002; TYNDALL; SACCARDI, 2005). Mesmo assim, há evidências de remissão clínica após transplantes em que a imunoablação foi incompleta e seguida por rápida reconstituição de células T autorreativas (DARLINGTON et al., 2013; SUN et al., 2004). Isso implica que, nos pacientes que atingem remissão clínica, fatores imunorreguladores devem inibir a proliferação de células autorreativas ou tornam-nas anérgicas após o transplante. Esses fatores podem tanto constituir efeitos não-específicos da terapia imunossupressora, como a linfopenia pós-transplante, quanto específicos, como a indução de células T reguladoras (Treg) e alteração no repertório dos receptores de células T (ALEXANDER et al., 2016; MURARO; DOUEK, 2006).

Nos pacientes com ES transplantados, são descritos reativação da função tímica (BOHGAKI et al., 2009; FARGE et al., 2005), redução da contagem de células B de memória (TSUKAMOTO et al., 2011), bem como aumento quantitativo e funcional das Tregs (BARAUT et al., 2014). Os pacientes que não responderam ao transplante apresentaram maior número de células B e uma tendência a menor diversidade do TCR, sugerindo que os clones de células T e B autorreativas possam ter se expandido preferencialmente às autotolerantes nos pacientes que apresentaram má resposta clínica ao transplante (FARGE et al., 2005). Adicionalmente, pacientes com menor função tímica após transplante apresentaram melhor resposta à terapia (BOHGAKI et al., 2009) e os valores de TREC (do inglês, *T-cell receptor excision circles*, marcador da função tímica) correlacionaram positivamente com os

níveis de autoanticorpos e de proteína C reativa (marcador de inflamação) (FARGE et al., 2005), contrariando diversos trabalhos da literatura que abordam transplantes em outras doenças autoimunes (ALEXANDER et al., 2009; MURARO et al., 2005, 2014). Apesar do importante papel das células B na patogenia da ES (SAKKAS; BOGDANOS, 2016), nenhum estudo até o momento avaliou de forma categórica o processo de deleção e renovação dos diversos subtipos de células B, assim como não existem trabalhos acerca de alterações da função medular induzida pelo TACTH ou sua influência na reconstituição de células B *naïve*, de memória ou reguladoras.

Desse modo, objetivamos no presente estudo melhorar a compreensão acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com ES submetidos ao TACTH, especialmente em relação às funções tímica e medular após transplante. Essa tese compõe o CEPID-FAPESP "Centro de Terapia Celular", processo N° 13/08135-2, subprojeto 12. Recebeu fomento adicional da FAPESP pelos processos N° 13/18678-3 e N° 14/20922-2. Foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa desta instituição (HCFMRP-USP 3639/01 e CONEP 371).

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esclerose sistêmica

A ES é uma doença autoimune inflamatória crônica do tecido conjuntivo, caracterizada por lesões microvasculares e diferentes graus de fibrose da pele e órgãos internos (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009; VAN DEN HOOGEN et al., 2013). É de raro acometimento, possuindo prevalência mundial de 150 a 300 casos por milhão de indivíduos, em sua maioria mulheres entre 30 e 45 anos (BARNES; MAYES, 2012). Apesar de não existirem dados publicados sobre a prevalência e incidência na população brasileira, uma vez se tratando de doença rara e ao alto grau de miscigenação brasileira, estima-se uma incidência de 12 casos por milhão de habitante e prevalência de 105 casos por milhão de habitantes (HORIMOTO et al., 2017). Sua etiologia envolve anormalidades vasculares e imunológicas, que convergem para a fibrose de vasos e órgãos vitais, caracterizando-se por pelo menos três processos patogênicos: deposição excessiva de colágeno e outras macromoléculas do tecido conjuntivo na pele e órgãos internos (pulmões, coração, trato gastrointestinal e rins); lesões vasculares; e alterações da imunidade humoral e celular, resultantes de reações autoimunes (ALLANORE et al., 2015; LEROY et al., 1988).

Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da ES ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que a mesma resulte de uma interação entre vários fatores desencadeantes genéticos e ambientais, aliados a defeitos nos processos de tolerância central e periférica, como redução do número/função de células reguladoras, bem como processos defeituosos na ontogenia de células T e B. A quebra dos mecanismos de tolerância central e periférico permite a geração e manutenção de células T e B autoimunes efectoras funcionais, que atuam cronicamente nos processos de destruição tecidual observado na ES (ALLANORE et al., 2015; DENTON; KHANNA, 2017; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011).

O desencadeamento da doença, apesar de pouco desvelado, provavelmente se inicia com a excessiva ativação de fibroblastos epiteliais em resposta a uma injúria vascular idiopática (possivelmente autoanticorpos, estresse oxidativo, infecções, dentre outros) em uma pessoa geneticamente suscetível (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). A aberrante ativação endotelial subsequente leva à descomedida expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, principalmente CCL2, além da ativação plaquetária e da produção de mediadores vasoconstritores e pró-trombóticos, notadamente CTGF e FGF, levando à instabilidade vascular e lesão por isquemia-reperfusão (ALLANORE et al., 2015). Em resposta à quimioatração, diversos subtipos de células inflamatórias são recrutados,

principalmente células T *helper* do tipo 2 (Th2), células B produtoras de autoanticorpos e de IL-6, macrófagos produtores de *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) e células dendríticas plasmocitóides produtoras de Interferon-α (IFN-α) (ALLANORE et al., 2015). Os fibroblastos residentes se tornam ativados pelos mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, produzindo excessivas quantidades de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*, ROS) e se diferenciando em miofibroblastos, que são os responsáveis pela demasiada produção de componentes da matriz extracelular, notadamente colágeno, e fibrose tecidual exorbitante que pode ocorrer virtualmente em qualquer tecido ou órgão (ALLANORE et al., 2015; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011).

As quimiocinas possuem destaque na patogênese e dano tecidual na ES, sendo relacionadas com a gravidade da doença e acometimento visceral. Altos níveis de CCL2 (MCP-1) são encontrados em biópsias de pele e sangue de pacientes com ES, juntamente com CCL3 (MIP-1α) e CCL4 (MIP-1β) (HASEGAWA; SATO; TAKEHARA, 1999). A CCL2 correlaciona-se, assim como a CCL3 e CCL7 (MCP-3), com maior acometimento visceral, principalmente pulmonar (HASEGAWA; SATO; TAKEHARA, 1999; YANABA et al., 2006). A quimiocina CXCL8 (IL-8) também possui papel na patogênese e fibrose tecidual, e se encontra aumentada nos pacientes com ES, independentemente da fase ou subtipo da doença (CODULLO et al., 2011). Adicionalmente, células endoteliais ativadas expressam VCAM e ICAM, resultando num maior recrutamento de células inflamatórias, principais fontes de TGF-β, PDGF, IL-1β e IL-6 e outros mediadores pró-fibróticos nos estágios iniciais da doença (TROJANOWSKA, 2010).

A desregulação de ambas as imunidades, inata e adaptativa, é característica da ES. Assinaturas proeminentes de interferon do tipo I em células circulantes ou infiltrantes nos órgãos afetados, como mastócitos, macrófagos e linfócitos B ativados, evidenciam ativação aberrante do sistema imune inato (ALLANORE et al., 2015; KIM et al., 2008). Uma das características alterações na imunidade adaptativa relacionada à esclerodermia é a baixa razão entre os perfis de resposta Th1/Th2 (WYNN, 2004). A resposta imune de perfil Th2 possui maior relevância na patogênese da ES do que os outros padrões, uma vez que as citocinas TGF-β, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 se correlacionam com a fibrose tecidual e encontram-se em concentrações elevadas cronicamente no soro dos pacientes (ALLANORE et al., 2015; BARAUT et al., 2010; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). Células T CD8⁺ *cytotoxic* (Tc) produtoras de IL-13 também atuam no desencadeamento da doença e apresentam-se proeminentemente na pele dos pacientes esclerodérmicos (FUSCHIOTTI et al., 2013).

Papel de destaque é dado às células B, especialmente às células B autorreativas de memória, que são consideradas cruciais na produção dos autoanticorpos anti-topoisomerase I (anti-Scl70) e anti-RNA polimerase III, classicamente associados à ES de mau prognóstico, apesar de não-patogênicos (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011; KAYSER; FRITZLER, 2015). Embora os pacientes esclerodérmicos apresentem contagem reduzida de células B de memória e alta contagem de células B *naïve*, as primeiras são importantes na patogênese da doença por expressarem altos níveis de CD19, CD40, CD80, CD86, CD95 e reduzida expressão de CD35 (DUMOITIER et al., 2017; SATO et al., 2004; SIMON et al., 2016; SOTO et al., 2015). Por outro lado, as células B *naïve* apresentam aumentada expressão de CD86 e CD19, sendo mais suscetíveis à ativação e demonstrando a desregulação da homeostase das células B na doença (SATO et al., 2004; SOTO et al., 2015). Além disso, o fator de ativação das células B (BAFF) é cronicamente elevado no soro e pele dos pacientes com ES, correlacionando-se com a atividade da doença (MATSUSHITA et al., 2006).

A ativação crônica e excessiva do sistema imunológico é agravada pelos baixos níveis de células T reguladoras (Treg) $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$, bem como pela sua reduzida capacidade supressora e deficiente produção de IL-10 e TGF- β (ANTIGA et al., 2010; BARAUT et al., 2014; FENOGLIO et al., 2011; PAPP et al., 2011). Essas células apresentam valor prognóstico, uma vez que pacientes com maiores contagens de Tregs apresentam menor escore clínico cutâneo de enrijecimento da pele (PAPP et al., 2011). Concomitantemente, as células B reguladoras (Breg) $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ têm sido descritas como reduzidas em número e na capacidade produtora de IL-10 nos pacientes com ES (ARAVENA et al., 2017; MATSUSHITA et al., 2016; MAVROPOULOS et al., 2016; SOTO et al., 2015), especialmente nos pacientes com fibrose pulmonar (MAVROPOULOS et al., 2016), desempenhando importante papel na patogênese da doença por se correlacionar inversamente com a atividade da doença (MATSUSHITA et al., 2016).

As alterações imunológicas e a ativação crônica de fibroblastos culminam em vasculopatia e microangiopatia, resultantes da obliteração proliferativa fibrointimal de pequenos vasos e episódios vasoespásmicos desencadeados pelo frio ou estresse. Essa condição, clinicamente conhecida como fenômeno de Raynaud, leva à isquemia tecidual, e é classicamente descrita na ES, usualmente precedendo os demais sintomas da doença (GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009). O dano vascular, que ocorre em praticamente todos os órgãos, consiste em grandes espaços entre as células endoteliais, perda da integridade do revestimento endotelial e vacuolização citoplasmática celular, levando à redução progressiva de capilares, espessamento dos vasos e estreitamento do lúmen, causando

hipóxia tecidual e estresse oxidativo. Os pulmões podem ser afetados de várias maneiras, principalmente por pneumonia intersticial inespecífica, evoluindo para fibrose pulmonar, ou por vasculopatia obliterante na hipertensão arterial pulmonar (HAP), caracterizada pelo espessamento da íntima dos vasos (MURRAY; RUBINOWITZ; HERZOG, 2012). Todo o trato gastrointestinal pode ser afetado por atrofia de músculo liso e fibrose, levando a doença gastrointestinal difusa e dismotilidade esofágica (ALLANORE et al., 2015; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011; SAMPAIO-BARROS et al., 2013). Nos rins, as artérias interlobulares são afetadas. Na crise renal esclerodérmica, as artérias mostram duplicação da lâmina elástica e proliferação da íntima com oclusão luminal. A glomerulonefrite, no entanto, não é uma característica comum da ES. No coração, há presença de isquemia e reperfusão, levando ao processo de necrose/fibrose e a alterações de condução e ritmo (ALLANORE et al., 2015; GABRIELLI; AVVEDIMENTO; KRIEG, 2009).

A ES apresenta alta variabilidade clínica entre os pacientes, e sua heterogeneidade tem sido observada nas manifestações clínicas (VAN DEN HOOGEN et al., 2013), perfil de produção de autoanticorpos (KAYSER; FRITZLER, 2015), tempo de progressão de doença, resposta a tratamento e sobrevida (RANQUE; MOUTHON, 2009), desafiando o estabelecimento de diagnóstico preciso e precoce, assim como o manejo terapêutico adequado. Em geral, a extensão do acometimento da pele e a taxa de progressão da doença refletem a severidade das complicações viscerais (DOMSIC et al., 2011).

Duas formas clínicas, baseadas na medida de acometimento cutâneo, são convencionalmente usadas para descrever os pacientes: ES cutânea limitada (ESl) e ES cutânea difusa (ESd) (ALLANORE et al., 2015; LEROY et al., 1988; SAMPAIO-BARROS et al., 2013). Na ESl, a fibrose cutânea é menos extensa e restrita à face e às regiões distais aos cotovelos e joelhos, como os dedos (esclerodactilia). O autoanticorpo mais comum é o anti-centrômero. A síndrome CREST é um subtipo da ESl e caracteriza-se pelo conjunto de manifestações clínicas: calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofágica, esclerodactilia e telangiectasia. Na ESl pode haver envolvimento visceral, principalmente HAP, de acometimento em geral mais tardio do que na ESd, na qual prevalecem os quadros pulmonares intersticiais. A ESd geralmente começa com lesões simétricas nos dedos e edema nas mãos, pouco tempo após a instalação do fenômeno de Raynaud. Com o tempo, o edema evolui para endureção e fibrose, generalizando-se e passando a envolver os braços e antebraços, face, tronco, e membros inferiores. As regiões proximais, como o tronco e face, são as mais afetadas. Eventualmente, ocorrem deformidades nas mãos, com contraturas fixas das articulações interfalangeanas proximais e, em muitos casos, autoamputação de falanges

distais, também presentes na ESI. Os autoanticorpos mais comuns são o anti-topoisomerase I e anti-RNA polimerase III. Há ritmo lento e progressivo de acometimento cutâneo, muitas vezes com manifestações viscerais e presença de calcinose (ALLANORE et al., 2015; LEROY et al., 1988). A ESd está associada a um pior prognóstico em comparação com a ESI, mas a mortalidade é alta em ambos os grupos, apresentando sobrevida média de 60% em cinco anos e de 40% em dez anos (ELHAI et al., 2012; RANQUE; MOUTHON, 2009), sendo o envolvimento cardiopulmonar a causa mais comum de morte desses pacientes (ELHAI et al., 2012; STEEN; MEDSGER, 2007).

O tratamento da ES é dificultado por se tratar de doença sistêmica, pleomórfica, multifatorial e de etiologia pouco conhecida, sendo baseado na extensão e gravidade das lesões e exigindo principalmente estratégias órgão-específicas (KOWAL-BIELECKA et al., 2009; NAGARAJA; DENTON; KHANNA, 2015). Medicamentos de efeito vasodilatador são usados quase que universalmente nos pacientes com ES, pela presença de fenômeno de Raynaud e vasculopatia. No tratamento da pele esclerodérmica, utiliza-se regularmente metotrexato e micofenolato mofetil ou baixas doses de ciclofosfamida endovenosa; pulsos mensais de ciclofosfamida em dosagens maiores, aliados a corticoides são empregados para tratamento do acometimento pulmonar; inibidores da enzima conversora da angiotensina associado a medidas de suporte e hemodiálise temporária são eficazes nos casos de envolvimento vascular renal; bem como inibidores da bomba protônica e pró-cinéticos, quando há acometimento do trato gastrointestinal (KOWAL-BIELECKA et al., 2009; SAMPAIO-BARROS et al., 2013). Mais recentemente, o rituximab (anti-CD20) tem sido investigado, principalmente nos casos de doença pulmonar intersticial (JORDAN et al., 2015).

O caráter idiopático da ES tem impedido o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas à etiologia da doença. Apesar de o manejo terapêutico órgão-específico ser razoavelmente eficiente no controle das manifestações clínicas da doença, existe pouco sucesso em retardar a progressão da doença (RANQUE; MOUTHON, 2009). Isso se deve à natureza não-curativa dos tratamentos, que falham em reestabelecer o estado de autotolerância imunológica. Sendo assim, a terapêutica deve ser mantida por longos períodos, acrescentando significativa morbimortalidade pela imunossupressão crônica.

Atualmente, o TACTH tem se mostrado promissora alternativa terapêutica para formas progressivas e graves de ES, impedindo a progressão da doença em pacientes refratários aos tratamentos convencionais por devolver o estado de autotolerância através do *resetting* do sistema imunológico e pela restauração das vias de regulação através do aumento

quantitativo e funcional de células reguladoras (BURT et al., 2013; FARGE et al., 2010; VAN LAAR et al., 2014).

2.2 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas para esclerose sistêmica

A iniciativa de se empregar o TACTH no tratamento da ES e outras doenças autoimunes surgiu a partir de dois conjuntos de evidências. A primeira delas originou-se da rara observação de casos onde pacientes que, apresentando concomitantemente doença autoimune e doença hematológica, após serem submetidos ao transplante de medula óssea alogênico para tratamento do distúrbio hematológico, obtiveram remissões prolongadas de ambas condições (NELSON et al., 1997).

O segundo conjunto de evidências originou-se de estudos utilizando modelos pré-clínicos de diversas doenças autoimunes, que foram revertidas pelo transplante de CTHs alogênicas ou autólogas e sugerindo que ambas abordagens seriam benéficas quando translacionadas para a clínica (VAN BEKKUM, 2003; VAN BEKKUM et al., 1989). A eficácia do transplante se mostrou totalmente dependente da completa erradicação dos componentes efetores da doença autoimune, observando-se que os condicionamentos mieloablativos (radiação + ciclofosfamida) eram mais eficazes do que os não-mieloablativos (ciclofosfamida apenas) na depleção de células T autorreativas de memória (VAN BEKKUM, 2000b). Ficou então postulado que a eficácia do TACTH se dá pela ação da radiação aplicada durante condicionamento sobre o repertório imunológico autoimune do hospedeiro, destruindo tanto células saudáveis quiescentes quanto as autorreativas em divisão, e o substituindo por células T autotolerantes do doador ao promover a ontogenia de um novo repertório imunológico saudável (VAN BEKKUM, 2000a, 2002).

Atualmente, o TACTH envolve a administração de CTHs autólogas, mobilizadas previamente da medula óssea do paciente para o sangue periférico utilizando ciclofosfamida em baixas doses e G-CSF, principalmente. Essas células possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em todos os tipos celulares maduros do sistema hematopoético e imunológico. O paciente é preparado para o transplante por um tratamento prévio com imunossupressor em altas doses, ciclofosfamida e globulina anti-timócito principalmente, seguido pela infusão de CTHs autólogas para a reconstituição dos sistemas hematopoético e imunológico (LI; SYKES, 2012; SYKES; NIKOLIC, 2005). As etapas do TACTH são sumarizadas na **Figura 1**.

Figura 1. Etapas do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Fonte: autor da tese (Arruda, LCM).

O primeiro relato de TACTH para ES foi publicado em 1997 por Tyndall e colaboradores (TYNDALL et al., 1997). Uma mulher de 37 anos, cinco anos após seu primeiro fenômeno de Raynaud, que apresentava rápido e grave acometimento de pele e fibrose pulmonar característicos de ESd, foi submetida ao transplante após condicionamento com altas doses de ciclofosfamida (200 mg/kg). Seis meses após TACTH, ela apresentou maior elasticidade da pele, menor enrijecimento cutâneo e das contraturas dos membros, aliado à melhora pulmonar considerável e redução abrupta dos níveis de anti-Scl70. Outro relato dos primórdios do TACTH na ES é o de uma paciente de 13 anos de idade com pneumopatia grave e progressiva, transplantada em junho de 1996 com CTHs CD34⁺ autólogas, após imunossupressão com altas doses de ciclofosfamida (200 mg/kg) associadas ao alemtuzumab (anti-CD52, 20 mg). Dois anos após o transplante, a paciente apresentava melhora nítida do quadro pulmonar e do escore de envolvimento cutâneo e da curva de crescimento (altura). A paciente tornou-se independente de corticosteroides, apesar de os autoanticorpos antinuclear e anti-Scl70 permanecerem positivos (MARTINI et al., 1999).

Pouco tempo depois desses relatos de caso, desenhos clínicos e recomendações envolvendo TACTH para doenças autoimunes foram publicados (TYNDALL; GRATWOHL, 1997) e a experiência do grupo europeu (*European Group for Blood and Marrow Transplantation*, EBMT) mostrou melhora dramática na fibrose dérmica após TACTH na ES (BINKS et al., 2001). Em 2009, o número de pacientes transplantados atingiu 224 indivíduos

na Europa (FARGE et al., 2010) e 97 na América do Norte e do Sul (PASQUINI et al., 2012). A atualização mais recente do EBMT, mostrou que 433 pacientes com ES foram transplantados até 2015, sendo a segunda patologia mais transplantada, ficando atrás apenas da EM (KELSEY et al., 2016).

É importante reiterar que o transplante autólogo tem sido usado preferencialmente na clínica ao alogênico devido ao potencial de rejeição observado em transplantes alogênicos, risco da ocorrência de GvHD (*Graft-Versus-Host-Disease*) e elevada toxicidade devido ao condicionamento mieloablativo, que resulta em altas taxas mortalidade (cerca de 22%) (DAIKELER et al., 2009) quando comparado ao autólogo (cerca de 9%) (FARGE et al., 2010). O regime de condicionamento mais frequentemente utilizado nos protocolos clínicos do TACTH para ES constitui altas doses ciclofosfamida (200 mg/kg) e ATG (*anti-thymocyte globulin*, globulina anti-timocítica, 4,5 mg/kg), sendo considerado não-mieloablativo. O condicionamento mieloablativo, constituído por irradiação corpórea total (TBI, *total body irradiation*) e/ou medicação citotóxica mieloablativa, é adotado por alguns grupos (*e.g.*, *Seattle/NIH consortium*), porém é mais oneroso e com mais efeitos adversos (infertilidade, leucemia e síndrome mielodisplásica secundárias), sendo portanto menos utilizado (BURT et al., 2006, 2010a; BURT; MILANETTI, 2011). Adicionalmente, regimes de condicionamento mieloablativos, nos quais utiliza-se TBI, têm sido associados a alto dano visceral quando comparado aos não mieloablativos. Nos Estados Unidos, um grupo de Seattle relatou a experiência com 18 pacientes submetidos a transplante autólogo com CTHs purificadas após condicionamento mioeloablativo com irradiação corporal total (800 cGy, com ou sem proteção pulmonar), ciclofosfamida (120 mg/kg) e ATG (90 mg/kg) (MCSWEENEY et al., 2002). Dois pacientes irradiados sem proteção pulmonar morreram de pneumonia intersticial e dois pacientes irradiados com proteção morreram de doença linfoproliferativa associada ao vírus Epstein Bar ou de insuficiência renal associada à progressão da doença, o que resultou na contraindicação de TBI no condicionamento e endossou o uso de medicações não-mieloablativas (SNOWDEN et al., 2012). Entretanto, esse mesmo grupo multicêntrico americano divulgou recentemente os resultados de seu estudo randomizado, mostrando que o transplante realizado com regime mieloablativo (incluindo TBI) foi muito superior ao tratamento convencional com pulsos de ciclofosfamida (SULLIVAN et al., 2017).

Estudos iniciais mostraram alta mortalidade relacionada ao transplante devido à inclusão de pacientes já demasiadamente graves, com sérios acometimentos viscerais, associado ao condicionamento agressivo e sua alta toxicidade. Em 2001, Binks e colaboradores reportaram resultados de fase I/II envolvendo 41 pacientes com ES e a

utilização de 7 diferentes regimes de condicionamento. Houve melhora das lesões cutâneas em 70% dos pacientes. No entanto, em relação ao envolvimento pulmonar, 16% dos pacientes melhoraram, 24% pioraram e 64% estabilizaram. Ocorreram 11 óbitos entre os 41 pacientes (26,8%), sendo 4 após a mobilização e antes do transplante (1 por progressão da doença, 2 por toxicidade da mobilização com 4 g/m² de ciclofosfamida e 1 por coronariopatia), e 7 após o transplante (4 por toxicidade e 3 por progressão da doença) (BINKS et al., 2001). Na experiência de Berlim, utilizando 200 mg/kg de ciclofosfamida e 90 mg/kg de ATG no condicionamento, entre três pacientes transplantados, um morreu no dia +2 pós-transplante por insuficiência cardíaca associada à fibrose cardíaca e pulmonar, e outros dois pacientes não mostraram melhora clínica ou sorológica (ROSEN et al., 2000). Nesse contexto, preconizou-se intensa avaliação cardíaca dos pacientes com ES previamente ao transplante, uma vez que quatro entre cinco mortes relacionadas ao TACTH ocorrem em pacientes que apresentam alterações cardíacas (BURT et al., 2013), que se associam concomitantemente à reduzida função pulmonar quando comparados aos pacientes com coração saudável.

A taxa de mortalidade relacionada ao TACTH foi de mais de 10% no final da década de 1990, mas foi melhorada para 2,5% nos últimos anos por causa da seleção mais criteriosa dos pacientes (FARGE; GLUCKMAN, 2011; SNOWDEN et al., 2012). Até hoje, mais de 400 pacientes com ES já foram incluídos em estudos clínicos de fase I/II, sendo relatada melhora de 25% ou mais no escore clínico de pele (medido pelo método de Rodnan modificado) em 70% dos pacientes após o procedimento. Em geral, a função pulmonar tendeu à estabilização, e a função renal geralmente manteve-se estável. Depois do seguimento de até 60 meses, 35% dos pacientes apresentaram melhora sustentada da doença, enquanto que 25% demonstraram progressão da doença (FARGE et al., 2002, 2004, 2010; KELSEY et al., 2016; MCSWEENEY et al., 2002; NASH et al., 2007; SULLIVAN et al., 2016; VONK et al., 2008). O grande avanço no manejo terapêutico e mudanças nos critérios de inclusão e exclusão levaram à atualizações das diretrizes acerca do uso do TACTH nas doenças autoimunes (SNOWDEN et al., 2012). Atualmente, os critérios de inclusão e exclusão constituem: doença cutânea difusa e/ou envolvimento pulmonar intersticial que esteja progredindo nos últimos 6 meses, a despeito de tratamento imunossupressor. A progressão do envolvimento cutâneo é definida por aumento do escore modificado de Rodnan (mRSS) maior do que 25% em 6 meses, enquanto a progressão do envolvimento pulmonar é definida por diminuição da capacidade vital forçada ou difusão de monóxido de carbono maior do que 10% em 6 meses.

Desde o começo do emprego do TACTH no tratamento de doenças autoimunes se preconizou a seleção de CTHs através do seu marcador específico, CD34. O transplante completo do enxerto, sem seleção prévia de CTHs, poderia reintroduzir células autorreativas após o processo de condicionamento e portanto reduzir a eficácia do mesmo (COLLINS, 1997; TYNDALL et al., 1997), com isso, a maioria dos estudos de fase I e II selecionavam as CTHs previamente ao transplante (KELSEY et al., 2016). Alguns estudos mostraram que, mesmo após intensa linfoablação, clones existentes previamente ao transplante se mantinham durante longos períodos após transplante, porém seu número e persistência não se associaram com a resposta clínica observada (FARGE et al., 2005; MURARO et al., 2005). Posteriormente observou-se que tais clones não eram oriundos do enxerto, mas sim de células não-depletadas durante o condicionamento, uma vez que as especificidades eram completamente diferentes entre amostras do pacientes pós-TACTH e enxerto, mas se assemelhavam àquelas presentes no período pré-TACTH (DUBINSKY et al., 2010). Nesse contexto, um estudo retrospectivo recente realizado pelo EBMT mostrou que não há benefício clínico na seleção de CTHs CD34⁺ previamente ao transplante em 138 pacientes com ES avaliados (OLIVEIRA et al., 2016). Em 65 pacientes houve seleção de CTHs previamente ao transplante, enquanto que em 73 não. Após 5 anos de acompanhamento, não houve nenhuma diferença na evolução clínica dos pacientes, mortalidade nem na sobrevida livre de doença. Curiosamente, os pacientes transplantados sem manipulação do enxerto apresentaram menores índices de recaída e reativação da doença após TACTH, uma vez que a seleção de CTHs, ao retirar as células potencialmente autorreativas, também remove células reguladoras do enxerto que são essenciais para a resposta ao transplante (OLIVEIRA et al., 2016).

Com base nos resultados favoráveis dos estudos clínicos de fase I/II acima citados, estudos randomizados, multicêntrico e controlados foram iniciados. O primeiro a ser publicado foi o *American Scleroderma Stem Cell versus Immune Suppression Trial* (ASSIST), estudo de centro único, que randomizou 19 pacientes com ES a receberem TACTH (n=10) ou pulsoterapia mensal de ciclofosfamida (n=9). Todos os pacientes transplantados, após condicionamento com 200 mg/kg de ciclofosfamida e 6.5 mg/kg de ATG, apresentaram melhora após um ano de acompanhamento, com aumento da função e volume pulmonar e da qualidade de vida, enquanto que nenhum dos pacientes tratados convencionalmente atingiram remissão clínica. Os autores então remanejaram 7 dos pacientes previamente tratados convencionalmente para o transplante (estudo cruzado), que, após um ano de acompanhamento, também apresentaram melhora na elasticidade da pele e da função pulmonar (BURT et al., 2011). O maior estudo de fase III já realizado, *Autologous Stem Cell*

Transplantation International Scleroderma Trial (ASTIS), randomizou 156 pacientes esclerodérmicos de 10 centros europeus a receberem TACTH (n=79) ou pulsoterapia mensal de ciclofosfamida (n=77). Após 10 anos de acompanhamento (mediana de 6 anos), os pacientes transplantados, após condicionamento 200 mg/kg de ciclofosfamida e 7.5 mg/kg de ATG, apresentaram maior sobrevida quando comparados aos não-transplantados, assim como maior sobrevida livre de doença (VAN LAAR et al., 2014). Apesar dos pacientes transplantados apresentarem maior taxa de complicações e mortalidade no primeiro ano, é importante ressaltar que, em ambos os estudos, o tratamento convencional da ES foi associado ao declínio contínuo da função pulmonar e piora das lesões na pele a longo prazo, além de diminuição da qualidade de vida, quando comparados aos pacientes que realizaram o TACTH. Um terceiro grande estudo randomizado, *Scleroderma: Cyclophosphamide or Transplantation* (SCOT), comparou 39 pacientes tratados com ciclofosfamida a 36 pacientes submetidos ao TACTH usando TBI (800 cGy), ciclofosfamida (120 mg/kg) e ATG (90 mg/kg) no condicionamento. Após 6 anos de acompanhamento, os pacientes transplantados apresentaram menor mortalidade e menor progressão da doença quando comparados àqueles tratados pela terapia convencional, além de terem apresentado baixa mortalidade relacionada à terapia (3%) (SULLIVAN et al., 2017).

Apesar da experiência com o TACTH para doenças autoimunes terem começado em meados da década de 90, estudos acerca dos mecanismos imunológicos da terapia começaram a ser publicados apenas no começo dos anos 2000 (ALEXANDER et al., 2016). As principais hipóteses sobre o mecanismo de ação do TACTH se baseavam na erradicação da resposta imune autopatogênica pelo condicionamento, causando um efeito anti-inflamatório através da eliminação das células T e B autorreativas e levando à redução do título de autoanticorpos; seguida pela ontogenia de um novo sistema imunológico e autotolerante pelas CTHs reinfundidas, através do aumento da contagem de células T reguladoras aliado à reativação da função tímica e normalização do repertório de células T (MURARO; DOUEK, 2006).

2.3 Mecanismos imunológicos do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Embora as terapias convencionais e as novas medicações imunobiológicas possam suprimir ou atenuar a resposta autoimune nos pacientes enquanto são empregadas, elas se mostram ineficientes em depletar a memória imunológica autorreativa e os mecanismos desencadeadores da doença, levando ao seu uso crônico por não devolver o estado de autotolerância imunológica aos pacientes. Em contrapartida, o TACTH surge embasado no conceito de que as altas doses de imunossupressão seguidas pelo transplante de CTHs leva a

uma extensiva reeducação do sistema imune por restaurar os mecanismos de autotolerância, levando os pacientes a longa remissão clínica e livres do uso de medicações adjuvantes (ALEXANDER et al., 2016).

A ação imediata do TACTH se dá pela depleção intensa do sistema imune e consequente destruição das células de memória autorreativas, refletida na acentuada redução do título de autoanticorpos antinucleares observada no lúpus (ALEXANDER et al., 2009; BURT et al., 2004) e anti-Scl70 na ES (FARGE et al., 2005; TSUKAMOTO et al., 2011) através da depleção de células B de memória $CD19^+IgD^-$ e plasmablastos $CD20^+CD27^{hi}$ no sangue periférico, bem como de plasmócitos de longa vida $CD38^+CD138^+$ na medula óssea (ALEXANDER et al., 2009). O mesmo foi observado em pacientes com dermatomiosite juvenil e neuromielite óptica, com respectiva redução após transplante dos níveis dos autoanticorpos antinucleares (ENDERS et al., 2014) e anti-aquaporina 4 (AOUAD et al., 2015). Tal-qualmente ocorre com as células T de memória autorreativas, agentes desencadeadores do dano autopatogênico assim como as células B. Em pacientes com EM, as contagem de células T específicas para proteína básica de mielina e glicoproteína da mielina de oligodendrócitos reduziram drasticamente após transplante, se associando à remissão clínica observada (DARLINGTON et al., 2013; SUN et al., 2004). O transplante também reduz o nível de células T invariantes $CD8^+CD161^{high}$ associadas à mucosa e produtoras de IL17, levando à extinção da inflamação no sistema nervoso central (ABRAHAMSSON et al., 2013). Em contrapartida, as medicações convencionais, como o rituximab, não reduzem o título de autoanticorpos por não depletarem os plasmócitos autorreativos de longa vida e consequentemente estão associadas a altos níveis de falha terapêutica (LOONEY et al., 2004).

A intensa depleção do sistema imune após transplante está associada a uma excessiva linfopenia, o que desencadeia mecanismos de reconstituição imunológica que visam repovoar os compartimentos celulares imunológicos. Nos primeiros meses após transplante ocorre grande proliferação homeostática (PH) de células residuais, com a rápida reconstituição da imunidade inata e das células B (ARRUDA, 2013). Apesar da PH ser capaz de restaurar níveis basais da contagem linfocitária, ela está associada a uma reduzida diversidade do TCR e consequentemente maior risco de infecções. O repertório de células T aumenta gradualmente após transplante mediante reativação da função tímica e restauração da produção de células T *naïve*, fonte de novas especificidades de novas células T, o que leva à eficiente resposta contra patógenos e ao *resetting* do sistema imunológico. Em pacientes com DM1 (MALMEGRIM et al., 2017) e EM (ARRUDA et al., 2016), níveis basais de células T, especialmente $CD4^+$, não foram alcançados mesmo depois de longos períodos após

transplante e constatada reativação tímica, portanto, a geração de um repertório diverso, constituído por diversas especificidades de TCR, é fundamental para o *resetting* do sistema imune. Nesse contexto, Muraro e colaboradores demonstraram que a eficácia do transplante não está associada à linfopenia mas sim à renovação do sistema imunológico e aumento da diversidade do TCR (MURARO et al., 2005, 2014).

Posteriormente, estudos dos mecanismos do TACTH mostraram que a remissão clínica observada em pacientes lúpicos era consequência não somente da eliminação da memória imunológica autorreativa, refletida pelo desaparecimento de anticorpos anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA), mas também da profunda renovação do sistema imune adaptativo, com duplicação do número de células recém-imigrantes tímicas $CD4^+CD31^+CD45RA^+$ após TACTH, regeneração tímica da produção de células T reguladoras, normalização do repertório das células T e da homeostasia das células B (ALEXANDER et al., 2009). O mesmo não ocorre nos pacientes com DM1, nos quais, mesmo após restaurada função tímica, a diversidade do TCR se mostrou diminuída durante longos períodos após transplante, não influenciando a resposta clínica, que esteve relacionada com a contagem de células T autorreativas (MALMEGRIM et al., 2017). Adicionalmente, num estudo francês envolvendo 7 pacientes esclerodérmicos, todos os pacientes apresentaram redução dos níveis de anti-Scl70 após transplante, especialmente nos pacientes que responderam à terapia (FARGE et al., 2005). Altas contagens de células B correlacionaram positivamente com altos níveis de anti-Scl70 e pior resposta ao TACTH, sugerindo que clones de células B autopatogênicos se expandiram preferencialmente nos pacientes de pior prognóstico. Em contrapartida, redução dos níveis de autoanticorpos não são observadas nos pacientes com DM1, não influenciando na resposta terapêutica (MALMEGRIM et al., 2017). Em pacientes com EM, mesmo após reconstituição dos níveis basais de autorreatividade, os pacientes apresentaram melhora clínica prolongada, indicando que outros mecanismos imunes atuam sinergicamente contribuindo para a restauração da autotolerância imunológica após TACTH (DARLINGTON et al., 2013; SUN et al., 2004), como o aumento da contagem de Tregs, observado em praticamente todos os estudos que avaliaram os mecanismos imunológicos do TACTH.

Como podemos observar na **Tabela 1**, muitos mecanismos são específicos de uma determinada condição autoimune, como a depleção de células T invariantes associadas à mucosa nos pacientes com EM ou aumento da razão Th1/Th2 na ES, enquanto outros são comungados entre todas elas, como a reativação tímica e consequente aumento da diversidade do TCR e da contagem de Tregs (**Tabela 1**). Nesse contexto, visando padronizar e refinar os imunofenótipos avaliados, além de prover recomendações práticas sobre a coleta de material e

monitoramento imunológico após transplante, o EBMT publicou suas recomendações (ALEXANDER et al., 2015).

Na ES em específico, muito pouco se sabe sobre quais são os principais mecanismos imunológicos que participam majoritariamente na resposta terapêutica. Alguns trabalhos mostram resultados contra-intuitivos, como redução da diversidade do TCR mesmo após reativação tímica (FARGE et al., 2005) e reduzida função tímica nos pacientes respondedores à terapia (BOHGAKI et al., 2009). Outros, por outro lado, apesar de demonstrarem mecanismos específicos da doença, como reduzida razão Th1/Th2 (TSUKAMOTO et al., 2011), não avaliaram grupo de pacientes não-respondedores e portanto não conseguem propor terapias adjuvantes para os pacientes refratários ao TACTH.

Tabela 1. Mecanismos imunológicos relacionados à resposta terapêutica do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com doenças autoimunes

Doença	Pacientes (n°)	Regime de Condicionamento	Seguimento (meses)	Mecanismos imunológicos	Referência
Esclerose Múltipla	4	CYC + TBI + ATG*	12	- Persistente redução dos níveis séricos de IL-12 após transplante; - Transiente redução de células T específicas para MBP de 3 a 9 meses após TACTH, reconstituindo níveis basais aos 12 meses; - Aumento da função tímica e maior diversidade do TCR 1 ano após transplante.	(SUN et al., 2004)
	7	CYC + TBI*	24	- Aumento aos 6 meses pós-TACTH da expressão de Fas nas células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ ; - Aumento persistente de Tsup CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ ; - Reativação da função tímica e maior diversidade do TCR 1 ano após transplante.	(MURARO et al., 2005)
	12	CYC + Alemtuzumab	24	- Aumento aos 6 meses pós-TACTH de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ FoxP3 ⁺ e de Tsup CD8 ⁺ CD57 ⁺ ; - Depleção persistente de MAITS CD8 ⁺ CD161 ^{hi} produtoras de IL-17 no sangue periférico e sistema nervoso central.	(ABRAHAMSSON et al., 2013)
	14	Busulfano + CYC + ATG*	24	- Aumento de 3 a 6 meses pós-TACTH de Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ FoxP3 ⁺ ; - Reativação da função tímica 1 ano após transplante; - Transiente redução de resposta Th17 e Tc17 específica a MBP, MOG e PLP de 6 a 18 meses pós-TACTH.	(DARLINGTON et al., 2013)
	24	BEAM + ATG*	12	- O repertório do TCR das células T CD4 ⁺ foi renovado completamente 1 ano após TACTH, o TCR das células T CD8 ⁺ se manteve oligoclonalmente expandido; - Os pacientes que recaíram após TACTH apresentaram menor diversidade do TCR.	(MURARO et al., 2014)

Esclerose Múltipla	16	CYC + ATG	24	- Extensiva mudança transcricional e normalizada expressão de genes relacionados à regulação imune nas células T de 1 a 2 anos após TACTH; - As células T CD8 ⁺ apresentaram maiores mudanças transcripcionais do que as CD4 ⁺ .	(A SOUSA et al., 2014)
	24	CYC + ATG	24	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ e maior expressão de CTLA-4 e GITR de 1 a 2 anos após TACTH; - Aumento de Tsup CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ e células exaustas PD1 ⁺ aos 6 meses pós-TACTH; - Persistente expressão normalizada dos microRNAs: miR-16, miR-155 and miR-142-3p; - Persistente expressão normalizada dos genes FOXP3, FOXO1, PDCD1 e IRF2BP2.	(ARRUDA et al., 2015)
	37	CYC + ATG	72	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ de 12 a 36 meses após TACTH e de Tsup CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ de 6 a 48 meses; - Pacientes respondedores apresentaram maiores níveis de células T/B exaustas PD1 ⁺ ;	(ARRUDA et al., 2016)
	18	CYC + ATG (11) ou BEAM + ATG (7)	24	- Normalizada expressão das moléculas relacionadas à apoptose A1, BAX, BAK, BIK, BIM _{EL} , BCL2, BCLX, BCL _{XL} , CIAP1/2, CFLIP _L , FAS e FASL aos 12 ou 24 meses após TACTH;	(DE OLIVEIRA et al., 2017)
	23	BEAM + ATG*	24	- Aumento de Tregs de memória CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} Foxp3 ⁺ CD45RA ⁻ e Th1 aos 6 meses após TACTH; - Pacientes respondedores apresentaram maiores contagens de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de memória na inclusão.	(KARNELL et al., 2017)
Esclerose Sistêmica	7	CYC*	12	- Respondedores apresentaram menos células B e lenta reconstituição de células T CD4 ⁺ ; - O repertório do TCR se manteve restrito durante todo acompanhamento e o sjTREC correlacionou negativamente com os valores de proteína C reativa.	(FARGE et al., 2005)

Esclerose Sistêmica	10	CYC*	12	- Não houve mudança na expressão do gene FOXP3; - Aumento na frequência de células T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ e IL-4 ⁺ até 6 meses pós-TACTH; - Pacientes respondedores apresentaram menores valores de sjTREC aos 3 meses após TACTH;	(BOHGAKI et al., 2009)
	11	CYC*	36	- Redução dos níveis séricos de TNF- α , TGF- β , IL-6 e sIL-2R de 3 meses a até 3 anos após TACTH; - Aumento persistente da razão Th1/Th2.	(TSUKAMOTO et al., 2011)
	7	CYC*	24	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL-10 ⁺ aos 2 anos pós-TACTH; - A atividade supressora das Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo} Tregs foi restaurada e atingiu níveis de pacientes saudáveis.	(BARAUT et al., 2014)
Doença de Crohn	24	CYC + ATG*	36	- Aumento da porcentagem de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{bright} de 6 meses a 2 anos após TACTH.	(BURT et al., 2010b)
	7	CYC + ATG	12	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ 1 ano após transplante;	(CLERICI et al., 2011)
Lúpus	7	CYC + ATG*	96	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ de 2 a 7 anos após TACTH.	(ALEXANDER et al., 2009)
	15	CYC + ATG*	96	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ a partir de 1 ano após transplante; - Aumento de Tsup CD8 ⁺ FoxP3 ⁺ e sua maior produção de TGF- β ; - Maior expressão de LAP, CD103, PD-1, PD-L1, e CTLA-4 por células T CD8 ⁺ .	(ZHANG et al., 2009)
Artrite Idiopática Juvenil	12	CYC + ATG + TBI*	24	- Aumento de Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ e maior expressão de CTLA-4 and GITR; - As células T específicas para hsp60 passaram de fenótipo inflamatório (IFN- γ ^{hi} e T-bet ^{hi}) para anti-inflamatório (IL-10 ^{hi} e GATA-3 ^{hi}).	(DE KLEER et al., 2006)

Dermatomiosite Juvenil	3	CYC + ATG + Fludarabina*	58	- Os marcadores de inflamação TNFR2, CXCL-10 e Galectin-9 diminuíram nos pacientes respondedores ao TACTH e se mantaram persistentemente elevados nos não-respondedores.	(ENDERS et al., 2014)
Diabetes Mellitus Tipo 1	13	CYC + ATG	36	- Redução sérica dos níveis de IL-1, IL-17 e TNF- α de 3 a 12 meses pós-TACTH; - O número de CTHs CD34 ⁺ reinfundidas foram positivamente correlacionadas com os níveis séricos de IL-10, IL-4 e TGF- β .	(LI et al., 2012)
	14	CYC + ATG	24	- Aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos <i>fas</i> e <i>fasL</i> e down-regulação do anti-apoptótico <i>bcl-xL</i> após TACTH alcançou níveis de controles saudáveis.	(DE OLIVEIRA et al., 2012)
	9	CYC + ATG	12	- Normalização da expressão gênica, alcançando níveis de controles saudáveis; - Os pacientes livres de insulina por curtos períodos apresentaram alta expressão de IFN- γ .	(ZHANG et al., 2012)
	21	CYC + ATG	72	- Reativação tímica a partir de 1 ano após TACTH, porém reduzida diversidade do TCR; - Os pacientes livres de insulina por longos períodos apresentaram menores níveis de autorreatividade de células T CD8 ⁺ específicas para proteínas beta pancreáticas, assim como maiores níveis de Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FoxP3 ⁺ e Tsup CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ .	(MALMEGRIM et al., 2017)

Para mobilização das CTHs, na maioria dos estudos foi-se utilizado 2 g/m² de ciclofosfamida acompanhada de 5-10 μ g/kg de G-CSF. *Enxerto com seleção de CTHs CD34⁺ ou com depleção de células T. TACTH, transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; CYC, ciclofosfamida; BEAM, *Carmustina, etoposido, citarabina e melfalano*; Alemtuzumab, mAb anti-CD52; G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor, filgrastima*; ATG, *antithymocyte globulin, globulina anti-timocítica*; Tregs, células T reguladoras; Tsup, células T supressoras; MAITS, *mucosal-associated invariant T-cells*; MBP, *myelin basic protein*; MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*; PLP, *proteolipid protein peptide*.

Desse modo, os mecanismos imunológicos podem ser específicos da doença autoimune estudada ou constituem mecanismos-padrão do próprio transplante, desencadeados pela intensa linfopenia e consequentes mecanismos de reconstituição imunológica timo-dependentes ou timo-independentes. Muito pouco se sabe sobre os mecanismos imunes nos pacientes com ES submetidos ao TACTH, e o papel das células B reguladoras e da função medular ainda necessitam ser esclarecidos para que possamos ter pleno conhecimento dos fatores mais importantes na indução de remissão clínica pós-TACTH e como desenhar terapias adjuvantes para os pacientes que não respondem ao transplante (SULLIVAN et al., 2016).

Hipótese e justificativa do estudo

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os tratamentos atuais disponíveis para a ES são pouco eficazes no controle da progressão da doença, principalmente em pacientes com doença rapidamente progressiva, grave e refratária à terapia convencional. Nesse contexto, novas abordagens terapêuticas para ES devem ser estudadas. Nos últimos anos, o aumento da experiência com o tratamento de pacientes esclerodérmicos com TACTH tem resultado em maior eficácia terapêutica, melhora da qualidade de vida e maior segurança do procedimento, fazendo do TACTH alternativa terapêutica promissora.

No entanto, existem ainda inúmeras questões não respondidas acerca dos mecanismos de ação sobre o sistema imunológico do TACTH na ES e sua influência na resposta terapêutica. A avaliação funcional do novo sistema imunológico reconstituído pelas células-tronco hematopoéticas autólogas, especialmente no tocante à ontogenia de células T e B pelas respectivas avaliações da função tímica e medular, são aspectos pendentes.

Nossa hipótese é que, após o transplante, os pacientes apresentem diminuição dos números de células T e B de memória, dos níveis dos autoanticorpos, das citocinas/quimiocinas envolvidas no processo de fibrose e deposição de colágeno, aliados à reativação da função tímica e consequente aumento da diversidade clonal do TCR pela maior contagem de células T *naïve*, do número e capacidade supressora de células T reguladoras, bem como maior função medular na produção de células B *naïve* autotolerantes e aumento da contagem e atividade funcional de células B reguladoras, levando à involução das lesões de pele e melhora clínica sistêmica. Desse modo, este estudo ajuda a esclarecer os mecanismos de ação imunológicos e os benefícios do TACTH no tratamento da ES, o que é necessário para aperfeiçoamento do protocolo clínico e possível aplicação desta terapia como tratamento de primeira linha da ES no futuro.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com esclerose sistêmica ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a reconstituição imunológica dos pacientes com esclerose sistêmica após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas através da função tímica e de medula óssea (**Manuscrito 4**);

- Avaliar o papel das células T e B reguladoras na resposta clínica observada nos pacientes com esclerose sistêmica após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (**Manuscrito 4**);

- Avaliar a influência do comprimento telomérico e das células senescentes e exaustas na resposta clínica observada nos pacientes com esclerose sistêmica após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (**Manuscrito 5**);

- Investigar o papel dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas na resposta clínica observada nos pacientes com esclerose sistêmica após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (**Manuscritos 5 e 6**);

- Avaliar a reconstituição imunológica, a longo prazo, após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas nos pacientes com esclerose sistêmica e sua associação com a evolução clínica (**Manuscrito 7**).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Manuscrito 1: *Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases: Specific Diseases and Controversies*

ABSTRACT

In the past two decades, the use of autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) to treat severe autoimmune diseases (ADs), such as multiple sclerosis (MS), systemic sclerosis (SSc), systemic lupus erythematosus (SLE), Crohn's disease (CDs), insulin dependent diabetes (IDD) and several other ADs, has expanded. Results from early feasibility studies led to wider indications and the proof of concept of how AHSCT is effective as treatment for SSc, MS and Crohn's has become established with the recent results of prospective trials. High dose immunosuppressive conditioning, followed by infusion of hematopoietic stem cells enables reconstitution of both hematological and immunological lineages while promoting immune resetting and further AD control. Clinical studies have established the potential of AHSCT to promote long-term progression-free survival in severe AD patients refractory to prior standard therapy. In parallel, unique mechanistic pathways have been reviewed, with the possibility to reverse autoimmunity and to halt auto-inflammation in this AD context. Further questions about the impact of graft selection, mobilization and conditioning regimens (higher or lower intensity) on the potential of AHSCT to induce remission of the AD are still under debate. Despite significant increase in knowledge over the years, controlled clinical trials are still warranted to further identify all beneficial effects of AHSCT over conventional treatment. It is also important to refine the understanding of immunological mechanisms associated with AHSCT for each type of AD. Heterogeneity of AD renders clinical research difficult in this setting and warrants innovative approaches that will contribute to enhance safety and improve transplant outcomes.

5.2 Manuscrito 2: *Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases*

ABSTRACT

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is currently investigated as treatment for severe and refractory autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (MS), systemic sclerosis (SSc), Crohn's disease (CD) and systemic lupus erythematosus. Randomized clinical trials in MS, SSc and CD have shown the efficacy of AHSCT to promote control of disease activity and progression, when compared to conventional treatment. The use of high dose immunosuppressive conditioning is essential to eliminate the autoimmune repertoire, and the re-infusion of autologous hematopoietic stem cells avoids long-term leucopenia by reconstitution of both immune and hematological systems. Recent studies showed that AHSCT is able to deplete the autoimmune compartment and further promote the formation of a new auto- tolerant immune repertoire, reducing the inflammatory milieu and leading to long-term clinical remission without any complementary post-graft treatment. Deep knowledge about the mechanisms of action related to AHSCT-induced remission is required for the management of possible post-AHSCT relapse and improvement of clinical protocols. This paper will review the mechanisms enrolled in the immune response resetting promoted by AHSCT in patients with autoimmune diseases.

5.3 Manuscrito 3: Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células tronco hematopoéticas em pacientes com doenças autoimunes

RESUMO

Nos últimos anos, ensaios clínicos têm demonstrado a eficácia do transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TACTH) em suprimir a atividade inflamatória em pacientes com doenças autoimunes (DAIs), induzindo remissões clínicas prolongadas em pacientes com diabetes do tipo 1, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, entre outras. A doença de Crohn se inclui nesta lista como principal doença inflamatória intestinal transplantada, por sua gravidade, e difícil manejo terapêutico, com alta taxa de refratariedade às terapias convencionais disponíveis. Apesar da grande experiência clínica acumulada durante os últimos 20 anos em que o TACTH tem sido investigado como tratamento para DAIs, dados sobre os mecanismos de ação envolvidos nessa terapia não existiam até 2004, quando os primeiros estudos de reconstituição imunológica começaram a ser publicados. Nesse contexto, o presente capítulo visa elucidar o processo de reconstituição imunológica após TACTH, assim como discutir os mecanismos de ação relacionados à terapia.

5.4 Manuscripto 4: *Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients*

ABSTRACT

To evaluate the immunological mechanisms associated with clinical outcomes after autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT), focusing on regulatory T- (Treg) and B- (Breg) cell immune reconstitution, 31 systemic sclerosis (SSc) patients underwent simultaneous clinical and immunological evaluations over 36-month post-transplantation follow-up. Patients were retrospectively grouped in responders (n=25) and non-responders (n=6), according to clinical response after AHSCT. Thymic function and B-cell neogenesis were respectively assessed by quantification of DNA excision circles generated during T- and B-cell receptor rearrangements as surrogate markers. At the one-year post-AHSCT evaluation of the total set of transplanted SSc patients, thymic rebound led to renewal of the immune system, with higher TCR diversity ($p<0.05$), positive correlation between recent thymic emigrant and Treg counts ($r_s=0.61$, $p<0.0001$), and higher expression of CTLA-4 ($p<0.01$) and GITR ($p<0.05$) on Tregs, when compared to pre-transplant levels. In parallel, increased bone marrow output of newly-generated naïve B-cells, starting at 6 months after AHSCT ($p<0.05$), renovated the B-cell populations in the peripheral blood. At 6 and 12 months after AHSCT, Bregs increased ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) and produced higher IL-10 levels ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) than before transplant. When the non-responder patients were evaluated in separate, Treg and Breg counts did not increase after AHSCT, and high TCR repertoire overlap between pre- and post-transplant periods indicated maintenance of underlying disease mechanisms. These data suggest that clinical improvement of SSc patients is related to increased counts of newly-generated regulatory T- and B-cells after AHSCT as result of coordinated thymic and bone marrow rebound.

5.5 Manuscripto 5: *Homeostatic proliferation leads to telomere attrition and increased PD-1 expression after autologous hematopoietic SCT for systemic sclerosis*

ABSTRACT

In the months that follow autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT), lymphopenia drives homeostatic proliferation, leading to oligoclonal expansion of residual cells. Here, we evaluated how replicative senescent and exhausted cells associated with clinical outcomes of 25 systemic sclerosis (SSc) patients who underwent AHSCT. Patients were clinically monitored for skin (modified Rodnan's skin score, mRSS) and internal organ involvement and had blood samples collected before and semiannually, until 3-years post-AHSCT, for quantification of telomere length, CD8⁺CD28⁻ and PD1⁺ cells, and serum cytokines. Patients were retrospectively classified as responders (n=19) and non-responders (n=6), according to clinical outcomes. At 6 months post-AHSCT, mRSS decreased ($P<0.001$) and the pulmonary function stabilized, when compared to pre-transplant measures. In parallel, inflammatory cytokine (IL-6, IL-1 β) levels and telomere lengths decreased, while PD-1 expression on T-cells and the number of CD8⁺CD28⁻ cells expressing CD57 and FoxP3 increased. After AHSCT, responder patients presented higher PD-1 expression on T- ($P<0.05$) and B- ($P<0.01$) cells and lower TGF- β , IL-6, G-CSF ($P<0.01$) and IL-1 β , IL-17A, MIP-1 α and IL-12 ($P<0.05$) levels than non-responders. Homeostatic proliferation after AHSCT results in transient telomere attrition and increased numbers of senescent and exhausted cells. High PD-1 expression is associated with better clinical outcomes after AHSCT.

5.6 Manuscrito 6: *Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients*

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a heterogeneous autoimmune disease characterized by auto-Ab production and predominant T-cell infiltration, resulting in excessive fibrosis within the skin and internal organs. The various cytokines and chemokines produced by the activated T cells contribute to recruiting additional inflammatory cells and to fibroblast activation, which promote extracellular matrix production and fibrosis. SSc has been related to a Th1/Th2 dysregulation, with increase in tissue expression and in circulating Th2 cytokine levels, namely interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-10.² Increased serum levels of IL-2, IL-6, TNF- α , IL-8 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 were also found in SSc patients. Although transforming growth factor (TGF)- β is one of the key mediators of increased collagen synthesis, TGF- β plasma levels did not appear to be increased in SSc patients. Among the endothelial markers analyzed in SSc patients, serum levels of E-selectin and P-selectin, as well as of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of PDGF were found to be increased. Therefore, the question remains if monitoring patients' serum cytokine profiles could be of help during routine clinical follow-up.

5.7 Manuscrito 7: *Long-term immune reconstitution and T-cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients*

ABSTRACT

The determinants of clinical responses after autologous hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) in systemic sclerosis (SSc) are still unraveled. We analyzed long-term immune reconstitution (IR) and T cell receptor (TCR) repertoire diversity in 10 SSc patients, with at least 6 years simultaneous clinical and immunological follow-up after aHSCT. Patients were retrospectively classified as long-term responders (A, n= 5) or non-responders (B, n= 5), using modified Rodnan's skin score (mRSS) and forced vital capacity (FVC%). All patients had similar severe SSc before aHSCT. Number of reinjected CD34⁺ cells was higher in group B versus A ($P= 0.02$). Long-term mRSS fall >25% was more pronounced in group A ($P= 0.004$), the only to improve long-term FVC% >10% ($P = 0.026$). There was an overall trend toward increased of T cell reconstitution in group B versus A. B cells had a positive linear regression slope in group A (LRS= 11.1) and negative in group B (LRS= -11.6). TCR repertoire was disturbed before aHSCT and the percentage of polyclonal families significantly increased at long-term ($P= 0.046$), with no difference between groups. Despite improved skin score after aHSCT in all SSc patients, pretransplant B cell clonal expansion and faster post-transplant T cell IR in long-term non-responder/relapsing patients call for new therapeutic protocols guided by IR analysis to improve their outcome.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O racional para a utilização do TACTH no tratamento das DAIs se baseia na depleção inespecífica do sistema imunológico autorreativo seguido da reconstituição de um sistema imune autotolerante, no contexto ideal em que os fatores ambientais desencadeantes não estarão mais presentes ou efetivos (MURARO et al., 2017; SWART et al., 2017). Conforme revisado nos **Manuscritos 1 a 3** e na **Sessão 2** da presente tese, diversos estudos elucidaram os mecanismos imunológicos do transplante em diferentes DAIs. A renovação do repertório imunológico e a reinstalação de mecanismos imunorreguladores são mecanismos sinérgicos e dependentes do regime de condicionamento, do tempo de acompanhamento e da doença de base (ABRAHAMSSON; MURARO, 2008; HÜGLE; DAIKELER, 2010; MURARO et al., 2017; MURARO; DOUEK, 2006; SWART et al., 2017). Apesar das taxas crescentes de sucesso clínico associadas ao TACTH na ES (DEL PAPA et al., 2016; SULLIVAN et al., 2016; SWART et al., 2017; VAN LAAR et al., 2014), ainda se faz necessária a melhora dos resultados clínicos, especialmente o controle em longo prazo da doença, sendo, portanto, essencial compreender completamente os mecanismos imunológicos envolvidos no procedimento. Dessa forma, é possível estabelecer estratégias mais específicas e efetivas de intervenção terapêutica que visem remissão duradoura. Nesse contexto, nosso estudo avaliou a reconstituição imunológica das subpopulações de células T e B após TACTH e os processos de reativação da função medular e tímica em pacientes com ES, com objetivo de entender os mecanismos de reconstituição imunológica nesses pacientes e possivelmente revelar biomarcadores de resposta terapêutica envolvidos nesse tratamento.

Utilizando a avaliação sequencial e multiplexada de sjTREC e β TREC, fomos capazes de estimar a taxa de proliferação timocitária. Nessa valia, reportamos no **Manuscrito 4**, pela primeira vez na literatura, que a capacidade de produção e exportação de células T pelo timo, estimada pela razão sjTREC/ β TREC, não é afetada pelo condicionamento envolvendo CYC e ATG, portanto não se mostrando tóxico ao timo. O dano tímico pela radiação justificaria a alta taxa de mortalidade relacionada ao transplante observada regimes de condicionamento mieloablativos (FARGE et al., 2010; MCSWEENEY et al., 2002), uma vez que a reconstituição adequada da função tímica é essencial para restituição da imunidade protetora a patógenos após transplante bem assim como no *resetting* imunológico (ALEXANDER et al., 2016; HAKIM et al., 2005). Adicionalmente, a redução transitória de TRECs seguida pela reativação da função tímica após transplante ocorreu exclusivamente nos pacientes transplantados, não sendo observada nos pacientes submetidos a terapias convencionais, e

seus níveis aumentados a longos prazos após TACTH sugere ontogenia duradoura de novas células T *naïve* e de Tregs naturais.

Diferentemente do reportado por Bohgaki e colaboradores (BOHGAKI et al., 2009), no qual os pacientes esclerodérmicos respondedores ao TACTH apresentaram menores níveis de sjTREC do que os não-respondedores, em nosso estudo os níveis de TRECs e RTEs não se relacionaram à resposta clínica observada após transplante. Tanto os pacientes respondedores, quanto os não-respondedores apresentaram mesmo perfil de função tímica durante todo o acompanhamento. Tal discrepância pode estar relacionada ao período pós-transplante avaliado, uma vez que no trabalho de Bohgaki e colaboradores os resultados foram obtidos aos 3 meses pós-TACTH, enquanto nossa avaliação iniciou aos 6 meses. Futuras avaliações em períodos mais curtos após transplante, entre 1 e 6 meses, irão esclarecer o papel da avaliação dos TRECs como fatores prognósticos do transplante.

Conforme descrito nos **Manuscritos 4 e 7**, antes do transplante, o TCR de todos os pacientes com ES se mostrou oligoclonalmente expandido e com distribuição não-gaussiana, característico da doença e representando um perfil autoimune (FARGE et al., 2005; SAKKAS et al., 2002). Tais perturbações no repertório do TCR se relacionam ao estado inflamatório crônico no qual os pacientes se encontram (BARAUT et al., 2010), exemplificado pelos altos níveis séricos de IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α e MCP-1, como apresentado no **Manuscrito 6**. A partir de 1 ano pós-transplante, a reativação da função tímica levou à substituição do sistema imunológico aberrante, com maior ontogenia de células T com diferentes especificidades, levando à diversificação do repertório do TCR para um perfil gaussiano e autotolerante, corroborando resultados obtidos em pacientes com EM (MURARO et al., 2005; SUN et al., 2004), mas não com DM1 (MALMEGRIM et al., 2017). De acordo com os **Manuscritos 5 e 6**, o aumento da diversidade do repertório do TCR foi acompanhado pela redução do estado inflamatório dos pacientes e redução dos níveis séricos de citocinas pró-fibróticas e de perfil Th2, notadamente TGF- β , classicamente associado ao intenso depósito de colágeno observado na doença (KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011), corroborando estudos prévios (TSUKAMOTO et al., 2011).

Nos pacientes respondedores, importante diversificação do TCR foi evidenciada pelas baixas taxas de sobreposição e pelo número reduzido de clonótipos compartilhados entre os períodos pré e pós-transplante, reiterando resultados obtidos pela análise do repertório de células T de pacientes com EM (MURARO et al., 2014). Adicionalmente, apesar do uso de imunossupressores em altas doses, nem todas as células T foram eficientemente deletadas, podendo ainda ser detectadas após o transplante, possivelmente se tratando de células

residuais, e não reinfundidas com o enxerto (DUBINSKY et al., 2010; MURARO et al., 2005). A presença notável da alta frequência de clones sobrepostos logo após o transplante, aliada à distribuição perturbada do TCR em pacientes que não responderam à terapia, sugere que muitas dessas células são potencialmente patogênicas, e o uso de imunossupressão adicional após o enxerto poderia ser benéfica neste subgrupo, conforme sugerido anteriormente (FARGE et al., 2002). De forma complementar, a alta sobreposição de clones de células T e reduzida diversidade do TCR foram observadas mesmo após reativação da função tímica, mostrando que nos pacientes não-responsivos ao TACTH não houve substituição dos clones autorreativos por autotolerantes gerados *de novo*, reiterando portanto o papel da manutenção da resposta autoimune na reativação clínica e na persistência dos mecanismos imunológicos de base (FARGE et al., 2005).

No **Manuscrito 7**, apesar da rápida reintrodução de medicações imunossupressoras para se controlar a reativação da doença nos períodos recentes após transplante, não fomos capazes de reestabelecer o estado de autotolerância nesses pacientes, uma vez que os pacientes não-respondedores apresentaram aumento persistente de células T após transplante quando comparados aos respondedores. Como não fomos aptos a avaliar a especificidade ou fenótipo mais detalhado dessas células, hipotetizamos que a maior parte delas constitui clones autorreativos e células inflamatórias, que justificariam os níveis elevados de citocinas inflamatórias observados nos pacientes que não responderam ao transplante, conforme descrito no **Manuscrito 5**. Adicionalmente, de forma contraditória ao **Manuscrito 4**, no **Manuscrito 7** mostramos o aumento da diversidade do TCR sustentada a longo prazo após o transplante em ambos os grupos, independentemente da resposta clínica. Porém, corroborando os dados do **Manuscrito 4**, algumas famílias expandidas oligoclonalmente ainda foram encontradas a longo prazo após o transplante tanto nos pacientes respondedores quanto nos que reativaram a doença pós-transplante, indicando que células T residuais ou reinfundidas possam ter sobrevivido e persistido por longos prazos, enquanto a recuperação da função tímica não foi propriamente alcançada. Dessa forma, uma vez que a reativação tímica participa da resposta clínica observada após transplante (ABRAHAMSSON; MURARO, 2008; ALEXANDER et al., 2009; FARGE et al., 2005), terapias adjuvantes para estimular a função tímica, como a administração exógena de IL-7 (PERALES et al., 2012; TOUBERT, 2012), poderiam ser úteis para melhorar a resposta clínica a longo prazo. Análises de alta performance do TCR (NGS) poderão guiar futuramente decisões de manejo terapêutico a longo prazo.

Conforme discutido acima e revisado nos **Manuscritos de 1 a 4** da presente tese, a reativação da função tímica é o mecanismo de ação mais importante associado à resposta clínica após TACTH (ALEXANDER et al., 2009, 2016; DELEMARRE et al., 2016; FARGE et al., 2005; MALMEGRIM et al., 2017; MURARO et al., 2005; SWART et al., 2017; SYKES; NIKOLIC, 2005). Apesar do papel fundamental no desfecho clínico, sua reativação é alcançada apenas cerca de um ano após o transplante. Durante os períodos iniciais após transplante, que precedem o ganho de função tímica, o curso clínico é ditado por vários mecanismos imunológicos complementares, onde destacam-se a intensa depleção de células autorreativas (DARLINGTON et al., 2013; DE KLEER et al., 2006; SUN et al., 2004) e a proliferação de células T reguladoras induzida por linfopenia (ARRUDA et al., 2015, 2016; DELEMARRE et al., 2016; MALMEGRIM et al., 2017). Além disso, a atrição imunológica resultante da alta taxa de proliferação homeostática de células residuais limita o espaço disponível para células autorreativas que não foram eficientemente eliminadas ou que foram reinfundidas com o enxerto, controlando o "espaço imunológico" com células senescentes ou exaustas. Isso ocorre enquanto novas células com maior diversidade e providas de funções imunorreguladoras mais elevadas ainda não estão sendo produzidas pelo timo (ALEXANDER et al., 2016; MURARO; DOUEK, 2006).

A intensa proliferação celular nesses períodos pode levar à atrição telomérica e consequentemente à disfunção celular, classicamente associada a vários distúrbios da medula óssea, incluindo anemia aplástica e malignidades hematopoiéticas (CALADO; YOUNG, 2009). Nos pacientes com ES, trabalhos prévios descreveram telômeros mais longos (MACINTYRE et al., 2008) e atividade de telomerase reduzida (TARHAN et al., 2008) quando comparados a controles saudáveis e a outras condições autoimunes, indicando um possível papel da aberrante biologia telomérica na etiologia da doença. No **Manuscrito 5**, mostramos redução proeminente do comprimento dos telômeros aos 6 meses, corroborando trabalhos prévios que descreveram o desgaste dos telômeros como limitado ao primeiro ano após transplante devido à alta taxa de proliferação homeostática nesses períodos que precedem a reativação tímica (AKIYAMA et al., 2000; ROBERTSON et al., 2001; RUFER et al., 2001). Essa redução se relacionou a um menor estado inflamatório dos pacientes, mostrado pela redução de citocinas inflamatórias descritas nos **Manuscritos 5 e 6**. Os valores T/S pré-transplante foram alcançados 1 ano pós-transplante, correlacionando com o período de reativação da função tímica (**Manuscrito 4**) e consequente exportação de células tímicas quiescentes que possuem telômeros maiores. A correlação negativa, observada entre o comprimento telomérico e as células senescentes CD8⁺CD28⁻, corrobora dados prévios

(MONTEIRO et al., 1996) e mostra que o encurtamento de telômeros após o TACTH provavelmente está relacionado à senescência celular no ambiente linfopênico (ARRUDA et al., 2015, 2016; MURARO; DOUEK, 2006; MURARO et al., 2005). Apesar do transplante não ter modificado significativamente a biologia dos telômeros, mostramos que ambos os grupos de resposta clínica apresentaram níveis semelhantes de comprimento dos telômeros durante todo o seguimento, indicando que, no contexto do TACTH para ES, o desgaste dos telômeros não está relacionado à resposta clínica.

Para avaliar-se o papel das células T e B na proliferação homeostática após transplante e na remissão clínica, avaliamos a expressão de PD1 por essas células, marcador de exaustão celular (MCKINNEY et al., 2015). Após transplante, a expressão de PD1 é necessária para a indução de autotolerância durante o estabelecimento da homeostase imune (THANGAVELU et al., 2011), podendo portanto contribuir para a melhora clínica. Em adição, altos níveis de PD1 são expressos mediante intensos ciclos de proliferação homeostática (ARRUDA et al., 2015; MURARO; DOUEK, 2006), provavelmente como mecanismo de autotolerância no ambiente linfopênico, evitando assim o desenvolvimento de doenças autoimunes secundárias (LE CAMPION et al., 2009). Em nossa experiência anterior envolvendo pacientes com EM submetidos ao TACTH, a alta expressão de PD1 por células T $CD8^+$, bem como por células B $CD19^+$, esteve relacionada a um melhor desfecho clínico (ARRUDA et al., 2016). Da mesma forma, nos pacientes com ES descritos no **Manuscrito 5**, o aumento na expressão de PD1 por células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foi observado apenas naqueles respondedores à terapia, indicando que a expressão de PD1 pode ser um viável marcador de resposta clínica ao transplante. Entretanto, não observamos correlação entre expressões de PD1 e comprimento de telômero, indicando que a expressão aumentada de PD1 também pode estar ligada à expressão normalizada de PDCD1 (ARRUDA et al., 2015). Aumento proeminente na frequência de células exaustas foi observado aos 6 meses pós-TACTH, período de reduzida função tímica (**Manuscrito 4**) e grande consumo sérico de IL-2 pelas células em intensa proliferação (**Manuscrito 6**), corroborando ainda mais a sua origem por exaustão proliferativa das mesmas. As células $PD1^+$ são mais suscetíveis à apoptose e se correlacionam com a frequência elevada de células $CD4^+Fas^+$ e $CD8^+Fas^+$ encontradas nas fases iniciais da reconstituição imune, bem como com o aumento da expressão de moléculas relacionadas à apoptose (DE OLIVEIRA et al., 2017, 2012; MURARO et al., 2005). Assim, células autorreativas residuais ou reinfundidas seriam deletados por tais mecanismos de tolerância periférica.

Esse intenso vazio imunológico nos períodos iniciais após transplante também é responsável pela proliferação induzida por linfopenia das Tregs, seguida pela geração tímica de Tregs naturais (DELEMARRE et al., 2016). Esse mecanismo parece não ser doença-específico e tem sido relatado em várias DAIs pós-transplante (ABRAHAMSSON et al., 2013; ALEXANDER et al., 2009; ARRUDA et al., 2015, 2016; BARAUT et al., 2014; BURT et al., 2010b; DARLINGTON et al., 2013; DE KLEER et al., 2006). Conforme descrevemos no **Manuscrito 4**, o TACTH foi capaz de induzir Tregs, principalmente nos pacientes respondedores, que adicionalmente apresentaram aumento de expressão de CTLA-4 e GITR. Isso nos mostra que o TACTH é capaz de restaurar a autotolerância imunológica em pacientes com ES, expandindo e promovendo a recuperação da função supressora de Tregs, já demonstrada em pacientes com EM (ARRUDA et al., 2016) e em um estudo piloto envolvendo pacientes esclerodérmicos (BARAUT et al., 2014). Atualmente, diversos perfis de ativação e função de Tregs estão sendo descritos (MASON et al., 2015; MIYARA; SAKAGUCHI, 2011), portanto análises subsequentes envolvendo avaliação fenotípica mais profunda dessas células será de muita valia para demonstrar seu detalhado papel no desfecho clínico após TACTH.

Os pacientes com doenças autoimunes têm redução na população de linfócitos supressores $CD8^+CD28^-$ (MIKULKOVA et al., 2010). Uma vez que essas células possuem propriedades imunorreguladoras (AUTTRAN et al., 1991; MOLLET et al., 1998), podem contribuir para a remissão da atividade inflamatória após transplante. Assim como previamente demonstrado em pacientes lúpicos (ZHANG et al., 2009), elucidamos no **Manuscrito 5** que, adicionalmente ao aumento de Tregs convencionais, as Tregs $CD8^+CD28^-FoxP3^+$ também expandem após transplante e constituem parte do grupo de mecanismos doença-inespecíficos, conforme já demonstrado na EM (ARRUDA et al., 2016; MURARO et al., 2005) e no DM1 (MALMEGRIM et al., 2017). O expressivo aumento da expressão de FoxP3 pelas células $CD8^+$ pode estar relacionado à normalização da expressão gênica de FOXP3 e de microRNAs que o regulam, observada pós-transplante em pacientes com EM (ARRUDA et al., 2015). No **Manuscrito 5**, a expansão dessas células ocorreu nos períodos recentes após TACTH, correlacionando com a redução telomérica resultante da alta taxa de proliferação homeostática característica dos períodos iniciais da reconstituição imunológica (MURARO; DOUEK, 2006). A expansão preferencial de células $CD8^+$ nos períodos de intensa linfopenia se dá pela maior disponibilidade de MHC-I (presente em todas células nucleadas) que fornece sinais mitogênicos em ambientes linfopênicos, juntamente com IL-7, para as células T naïve e de memória residuais ou reinfundidas se multiplicarem, facilitando a

reconstituição das células T CD8⁺ após o TACTH. Esses dados são demonstrados no **Manuscrito 4**, onde a razão CD4/CD8 reduziu intensamente após transplante. Apesar dos linfócitos supressores CD8⁺CD28⁻ não apresentarem destacada participação no resultado clínico após TACTH, apresentaram uma tendência ao aumento nos pacientes respondedores, indicando um possível papel das mesmas na proliferação homeostática, atrito imunológico e desfecho clínico após o transplante. Estudos a longo prazo que levem em consideração seu potencial efector poderão melhor elucidar o papel dessas células na resposta à terapia.

No tocante às células B, existe pouco conhecimento quanto à sua ontogenia e influência no desfecho clínico no contexto do TACTH para DAIs. No **Manuscrito 4**, conseguimos identificar a produção sustentada de células B quiescentes recém-geradas pela medula óssea após-transplante, indicando que a reativação medular contribui para a geração de um novo sistema imunológico, refletido no aumento dos níveis de sjKREC, no aumento da contagem de células B *naïve* e nas reduzidas taxas de proliferação de células B no sangue periférico durante todo o seguimento. Vale salientar que altas taxas de divisão de células B estão relacionadas a um estado de hiperativação de células B *in vivo* (GLAUZY et al., 2014), e terapias convencionais (como rituximab) mostraram ineficientes em restaurar os mecanismos de tolerância central das células B (CHAMBERLAIN et al., 2016). Isto indica que, a partir dos primeiros períodos após transplante, a reconstituição do compartimento periférico das células B deve-se principalmente à alta atividade da medula óssea na ontogenia de células B autotolerantes no lugar de clones que possam ter resistido ao condicionamento ou reinfundidos e sofrido expansão homeostática. Porém, se o aumento da função medular se mantém por longos períodos, avaliações a longo prazo irão responder, mas conforme observado no **Manuscrito 7**, pacientes respondedores ao transplante por longos períodos apresentaram maior reconstituição de células B do que os não-respondedores, indicando um possível papel da reativação medular pós-TACTH.

Dentre as células B, as CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} constituem população bem caracterizada de Bregs, desempenhando importante papel no controle de respostas autoimunes (MAURI; BOSMA, 2012). Nesse contexto, sua diminuição em número e função tem sido relatada em várias doenças autoimunes (BLAIR et al., 2010; FLORES-BORJA et al., 2013; MENON et al., 2016), principalmente nos pacientes esclerodérmicos, onde são descritas como marcadores de atividade da doença (MATSUSHITA et al., 2016). Até o momento, não há relatos disponíveis sobre os níveis de Breg após o TACTH. No **Manuscrito 4**, mostramos que as Breg aumentaram significativamente de forma transitória após transplante, tendendo a permanecer maior que os valores basais por pelo menos 2 anos. Além disso, a razão entre as

Breg e as células B de memória aumentaram persistentemente durante todo o acompanhamento, bem como apresentaram maior produção de IL-10, indicando, portanto, que essas células devem estar envolvidas no restabelecimento da autotolerância após o TACTH. No **Manuscrito 7**, descrevemos maiores níveis de células B nos pacientes respondedores, mas análises mais detalhadas quanto ao seu fenótipo irão esclarecer se essas células são reguladoras.

Embora a ontogenia das Bregs ainda não seja completamente compreendida (MAURI; BOSMA, 2012), as mesmas se correlacionaram positivamente com os valores de sjKREC, indicando que as Bregs poderiam ser derivadas da medula óssea e, conseqüentemente, aumentarem após TACTH devido ao aumento da função medular descrita no **Manuscrito 4**. Nesse cenário, modelos experimentais da doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) mostraram que as Bregs oriundas do enxerto são importantes para a supressão da GvHD crônica esclerodérmica murina durante a reconstituição imunológica (LE HUU et al., 2013), indicando que terapias baseadas nas Bregs para o tratamento de SSc devem ser investigadas no futuro.

No **Manuscrito 6**, mostramos que os níveis elevados de IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1 e IFN- γ observados em pacientes com SSc antes do transplante refletem seu estado clínico inflamatório (BARAUT et al., 2010), e que sua redução se relaciona à regressão da fibrose clínica cutânea. A relação entre os níveis séricos das citocinas e a resposta clínica ao transplante foi mostrada no **Manuscrito 5**, no qual os pacientes não respondedores mantiveram altos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e fibróticas quando comparados aos respondedores, especialmente TGF- β , IL-17 e IL-6, classicamente associadas a um maior acometimento visceral e mau prognóstico da doença (GOURH et al., 2009; KATSUMOTO; WHITFIELD; CONNOLLY, 2011). O papel dessas citocinas na regressão ou manutenção da fibrose clínica deve ser mais bem avaliada através da análise sequencial de biópsias de pele, visando-se melhor entender quais mecanismos participam mais ativamente na remissão clínica cutânea e assim traçar novas alternativas terapêuticas para os pacientes com doença reativada pós-TACTH, como o uso de anticorpos monoclonais anti-TGF- β (Fresolimumab) (RICE et al., 2015), anti-IL-17 (Brodalumab) (WASILEWSKA et al., 2016), anti-IL-6 (Siltuximab) (O'REILLY et al., 2013), dentre outros.

Sumário

7 SUMÁRIO

– A reativação da função tímica é alcançada um ano após transplante e resulta na maior exportação de células T *naïve* recém-emigradas do timo e maior diversidade do TCR.

– A alta renovação da diversidade do TCR como resultado da mudança de especificidades e baixo *overlap* de repertório está associada à eficácia terapêutica do transplante.

– O aumento da contagem de células T reguladoras se correlaciona com a reativação da função tímica e se associa à eficácia terapêutica do transplante.

– A função medular aumenta a partir de um ano após transplante e promove maior produção de células B *naïve* e reguladoras, resultando numa menor taxa de proliferação de células B no sangue periférico devido à restauração da tolerância central.

– O aumento da contagem de células B reguladoras é acompanhado pelo aumento da produção de IL-10, correlaciona com o aumento da função medular e se associa à eficácia terapêutica do transplante.

– A atrição do comprimento telomérico não influencia na resposta terapêutica ao transplante.

– A alta taxa de proliferação homeostática nos períodos iniciais após transplante resulta no aumento de células senescentes e exaustas, que se associam à eficácia terapêutica do procedimento.

– O transplante reduz o nível de citocinas inflamatórias e pró-fibróticas, que se associam à sua eficácia terapêutica.

– A falha terapêutica do transplante a longo prazo está associada ao persistente aumento de células T.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

A reativação das funções tímica e medular é crucial para a eficácia terapêutica do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas nos pacientes com esclerose sistêmica. Sinergicamente, promovem renovação das especificidades do repertório de células T e maior exportação de células T e B reguladoras, que, conjuntamente com o aumento de células exaustas e baixos níveis de citocinas inflamatórias e pró-fibróticas, se associam à resposta clínica observada.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A SOUSA, A. D. P. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation reduces abnormalities in the expression of immune genes in multiple sclerosis. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 120, p. 111–120, 2014.

ABRAHAMSSON, S.; MURARO, P. A. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Autoimmunity**, v. 41, n. 8, p. 577–584, 2008.

ABRAHAMSSON, S. V. et al. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2888–2903, 2013.

AKIYAMA, M. et al. Shortening of telomeres in recipients of both autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 25, n. 4, p. 441–447, 2000.

ALEXANDER, T. et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. **Blood**, v. 113, n. 1, p. 214–223, 2009.

ALEXANDER, T. et al. SCT for severe autoimmune diseases: Consensus guidelines of the European Society for Blood and Marrow Transplantation for immune monitoring and biobanking. **Bone Marrow Transplantation**, v. 50, n. 2, p. 173–180, 2015.

ALEXANDER, T. et al. Resetting the immune system with immunoablation and autologous haematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 34, n. 4 Suppl 98, p. 53–57, 2016.

ALLANORE, Y. et al. Systemic sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–21, 2015.

ANTIGA, E. et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. **British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 5, p. 1056–1063, 2010.

AOUAD, P. et al. Resolution of aquaporin-4 antibodies in a woman with neuromyelitis optica treated with human autologous stem cell transplant. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1215–1217, 2015.

ARAVENA, O. et al. TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. **Arthritis research & therapy**, v. 19, n. 1, p. 8, 2017.

ARRUDA, L. C. M. **Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e esclerose múltipla**. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2013.

ARRUDA, L. C. M. et al. Autologous hematopoietic SCT normalizes miR-16, -155 and -142-3p expression in multiple sclerosis patients. **Bone marrow transplantation**, v. 50, n. 3, p. 380–389, 2015.

ARRUDA, L. C. M. et al. Immunological correlates of favorable long-term clinical outcome in multiple sclerosis patients after autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 169, p. 47–57, 2016.

AUTRAN, B. et al. A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. **Blood**, v. 77, n. 10, p. 2237–2241, 1991.

BARAUT, J. et al. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 2, p. 65–73, 2010.

BARAUT, J. et al. Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 3, p. 349–354, 2014.

BARNES, J.; MAYES, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 165–170, 2012.

BINKS, M. et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 60, n. 6, p. 577–84, 2001.

BLAIR, P. A. et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 129–140, 2010.

BOHGAKI, T. et al. Immunological Reconstitution after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Systemic Sclerosis: Relationship Between Clinical Benefits and Intensity of Immunosuppression. **Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 6, p. 1240–1248, 2009.

BURT, R. K. et al. Non-myeloablative stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 26, n. 1–2, p. 57–69, 2004.

BURT, R. K. et al. Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: the evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 12, p. 3750–60, 2006.

BURT, R. K. et al. Risks of Immune System Treatments. **Science**, v. 328, n. 5980, 2010a.

BURT, R. K. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe anti-TNF refractory Crohn disease: Long-term follow-up. **Blood**, v. 116, n. 26, p. 6123–6132, 2010b.

BURT, R. K. et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9790, p. 498–506, 2011.

BURT, R. K. et al. Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis. **The Lancet**, v. 381, n. 9872, p. 1116–1124, 2013.

BURT, R. K.; MILANETTI, F. Hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis : history and current status. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 23, n. 6, p.519-29, 2011.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–65, 2009.

CHAMBERLAIN, N. et al. Rituximab does not reset defective early B cell tolerance checkpoints. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 282–287, 2016.

CLERICI, M. et al. Immunomodulatory effects of unselected haematopoietic stem cells autotransplantation in refractory Crohn's disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 12, p. 946–952, 2011.

CODULLO, V. et al. An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 6, p. 1115–21, 2011.

COLLINS, R. H. Autologous haemopoietic stem cell transplantation. **The Lancet**, v. 349, n. 9055, p. 881, 1997.

DAIKELER, T. et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. **Bone marrow transplantation**, v. 44, n. 1, p. 27–33, 2009.

DARLINGTON, P. J. et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. **Annals of Neurology**, v. 73, p. 341–354, 2013.

DE KLEER, I. et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4 +CD25+ immune regulatory network. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1696–1702, 2006.

DE OLIVEIRA, G. L. V. et al. Defective expression of apoptosis-related molecules in multiple sclerosis patients is normalized early after autologous haematopoietic stem cell transplantation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 187, n. 3, p. 383–398, 2017.

DE OLIVEIRA, G. L. V et al. Up-regulation of fas and fasL pro-apoptotic genes expression in type 1 diabetes patients after autologous haematopoietic stem cell transplantation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 168, n. 3, p. 291–302, 2012.

DEL PAPA, N. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation has better outcomes than conventional therapies in patients with rapidly progressive systemic sclerosis. **Bone Marrow Transplantation**, v. 52, p. 53–58, 2016.

DELEMARRE, E. M. et al. Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional renewal and TCR diversification of regulatory T cells. **Blood**, v. 127, n. 1, p. 91–101, 2016.

DENTON, C. P.; KHANNA, D. Systemic sclerosis. **The Lancet**, v. S0140-6736, n. 17, p. 30933–9, 2017.

DOMSIC, R. T. et al. Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 104–109, 2011.

DUBINSKY, A. N. et al. T-cell clones persisting in the circulation after autologous hematopoietic SCT are undetectable in the peripheral CD34+ selected graft. **Bone marrow transplantation**, v. 45, n. 2, p. 325–331, 2010.

DUMOITIER, N. et al. Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor β and Activate Fibroblasts. **Arthritis & Rheumatology**, v. 69, n. 5, p. 1078–1089, 2017.

ELHAI, M. et al. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Rheumatology**, v. 51, n. 6, p. 1017–1026, 2012.

ENDERS, F. B. et al. Autologous stem cell transplantation leads to a change in proinflammatory plasma cytokine profile of patients with juvenile dermatomyositis correlating with disease activity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 1, p. 315–317, 2014.

FARGE, D. et al. Autologous bone marrow transplantation in the treatment of refractory systemic sclerosis: Early results from a French multicentre phase I-II study. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 3, p. 726–739, 2002.

FARGE, D. et al. Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: report from the EBMT/EULAR Registry. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 8, p. 974–981, 2004.

FARGE, D. et al. Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 5, p. 1555–1563, 2005.

FARGE, D. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: An observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. **Haematologica**, v. 95, n. 2, p. 284–292, 2010.

FARGE, D.; GLUCKMAN, E. Autologous HSCT in systemic sclerosis: A step forward. **The Lancet**, v. 378, n. 9790, p. 460–462, 2011.

FENOGLIO, D. et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. **Clinical Immunology**, v. 139, n. 3, p. 249–257, 2011.

FLORES-BORJA, F. et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Science translational medicine**, v. 5, n. 173, p. 173ra23, 2013.

FUSCHIOTTI, P. et al. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 1, p. 236–246, 2013.

GABRIELLI, A.; AVVEDIMENTO, E. V.; KRIEG, T. Scleroderma. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 19, p. 1989–2003, 2009.

GLAUZY, S. et al. Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. **Blood**, v. 124, n. 15, p. 2459–2462, 2014.

GOURH, P. et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 5, p. R147, 2009.

HAKIM, F. T. et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 930–939, 2005.

HASEGAWA, M.; SATO, S.; TAKEHARA, K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 117, n. 1, p. 159–65, 1999.

HORIMOTO, A. M. C. et al. Incidência e prevalência de esclerose sistêmica em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 2, p. 107–114, 2017.

HÜGLE, T.; DAIKELER, T. Stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Haematologica**, v. 95, n. 2, p. 185–188, 2010.

JORDAN, S. et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 6, p. 1188–94, 2015.

KARNELL, F. G. et al. Reconstitution of immune cell populations in multiple sclerosis patients after autologous stem cell transplantation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 189, n. 3, p. 268–278, 2017.

KATSUMOTO, T. R.; WHITFIELD, M. L.; CONNOLLY, M. K. The pathogenesis of systemic sclerosis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 509–537, 2011.

KAYSER, C.; FRITZLER, M. J. Autoantibodies in systemic sclerosis: Unanswered questions. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 167, 2015.

KELSEY, P. J. et al. Haematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: From basic science to clinical practice. **Current Research in Translational Medicine**, v. 64, n. 2, p. 71–82, 2016.

- KIM, D. et al. Induction of interferon- α by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: Association of higher interferon- α activity with lung fibrosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 7, p. 2163–2173, 2008.
- KOWAL-BIELECKA, O. et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 5, p. 620–8, 2009.
- LE CAMPION, A. et al. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. **Blood**, v. 114, n. 9, p. 1784–1793, 2009.
- LE HUU, D. et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3274–3283, 2013.
- LEROY, E. C. et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. **Journal of Rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 202–205, 1988.
- LI, H. W.; SYKES, M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 6, p. 403–416, 2012.
- LI, L. et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Modulates Immunocompetent Cells and Improves β -Cell Function in Chinese Patients with New Onset of Type 1 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 97, n. 5, p. 1729–1736, 2012.
- LOONEY, R. J. et al. B Cell Depletion as a Novel Treatment for Systemic Lupus Erythematosus A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Rituximab. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**, v. 50, n. 8, p. 2580–2589, 2004.
- MACINTYRE, A. et al. Association of increased telomere lengths in limited scleroderma, with a lack of age-related telomere erosion. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 12, p. 1780–1782, 2008.
- MALMEGRIM, K. C. R. et al. Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 167, 2017.
- MARTINI, A. et al. Marked and sustained improvement two years after autologous stem cell transplantation in a girl with systemic sclerosis. **Arthritis and rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 807–11, 1999.
- MASON, G. M. et al. Phenotypic Complexity of the Human Regulatory T Cell Compartment Revealed by Mass Cytometry. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2030–2037, 2015.
- MATSUSHITA, T. et al. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 192–201, 2006.
-

MATSUSHITA, T. et al. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 55, n. 2, p. 263–267, 2016.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 221–241, 2012.

MAVROPOULOS, A. et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients with Systemic Sclerosis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 2, p. 494–504, 2016.

MAYES, M. D. et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 8, p. 2246–2255, 2003.

MCKINNEY, E. F. et al. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. **Nature**, v. 523, n. 7562, p. 612–616, 2015.

MCSWEENEY, P. A. et al. High-dose immunosuppressive therapy for severe systemic sclerosis: initial outcomes. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1602–10, 2002.

MENON, M. et al. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 683–697, 2016.

MIKULKOVA, Z. et al. Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. **Cellular immunology**, v. 262, n. 2, p. 75–9, 2010.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 3, p. 346–351, 2011.

MOLLET, L. et al. CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. **International immunology**, v. 10, n. 3, p. 311–23, 1998.

MONTEIRO, J. et al. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 156, n. 10, p. 3587–3590, 1996.

MURARO, P. A et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 5, p. 805–816, 2005.

MURARO, P. A. et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1168–1172, 2014.

MURARO, P. A. et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 7, p. 391–405, 2017.

- MURARO, P. A.; DOUEK, D. C. Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggression. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 2, p. 61–67, 2006.
- MURRAY, L. A.; RUBINOWITZ, A.; HERZOG, E. L. Interstitial lung disease. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 656–662, 2012.
- NAGARAJA, V.; DENTON, C. P.; KHANNA, D. Old medications and new targeted therapies in systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 54, n. 11, p. 1944–1953, 2015.
- NASH, R. A. et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1388–1396, 2007.
- NELSON, J. L. et al. Pre-existing autoimmune disease in patients with long-term survival after allogeneic bone marrow transplantation. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 48, p. 23–9, 1997.
- O'REILLY, S. et al. Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? **Clinical & translational immunology**, v. 2, n. 4, p. e4, 2013.
- OLIVEIRA, M. C. et al. Does ex vivo CD34+ positive selection influence outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients? **Bone Marrow Transplantation**, v. 51, n. 4, p. 501–505, 2016.
- PAPP, G. et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 40, n. 3, p. 205–210, 2011.
- PASQUINI, M. C. et al. Transplantation for Autoimmune Diseases in North and South America: A Report of the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 10, p. 1471–1478, 2012.
- PERALES, M.-A. et al. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. **Blood**, v. 120, n. 24, 2012.
- RANQUE, B.; MOUTHON, L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. A311–A318, 2009.
- RICE, L. M. et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 7, p. 2795–2807, 2015.
- ROBERTSON, J. et al. Telomere length Accelerated telomere shortening following allogeneic transplantation is independent of the cell source and occurs within the first year post transplant. **Bone Marrow Transplantation**, v. 27, p. 1283–1286, 2001.
- ROSEN, O. et al. Autologous stem-cell transplantation in refractory autoimmune diseases after in vivo immunoablation and ex vivo depletion of mononuclear cells. **Arthritis research**, v. 2, n. 4, p. 327–36, 2000.
-

RUFER, N. et al. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. **Blood**, v. 97, n. 2, p. 575–577, 2001.

SAKKAS, L. I. et al. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 7, p. 3649–3659, 2002.

SAKKAS, L. I.; BOGDANOS, D. P. Systemic sclerosis: New evidence re-enforces the role of B cells. **Autoimmunity reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–61, 2016.

SAMPAIO-BARROS, P. D. et al. Recommendations for the management and treatment of systemic sclerosis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 3, p. 258–275, 2013.

SATO, S. et al. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 6, p. 1918–1927, 2004.

SIMON, D. et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 34, n. 5, p. 30–36, 2016.

SNOWDEN, J. A. et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 47, n. 6, p. 770–90, 2012.

SOTO, L. et al. Systemic sclerosis patients present alterations in the expression of molecules involved in B-cell regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 496, 2015.

STEEN, V. D.; MEDSGER, T. A. Changes in Causes of Death in Systemic Sclerosis, 1972–2002. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 7, p. 940–4, 2007.

SULLIVAN, K. et al. Myeloablative Autologous Transplantation of CD34⁺ Selected Hematopoietic Stem Cells (HSCT) vs Monthly Intravenous Cyclophosphamide (CY) for Severe Scleroderma with Internal Organ Involvement: Outcomes of a Randomized North American Clinical Trial. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 23, n. 3, p. S23–S24, 2017.

SULLIVAN, K. M. et al. Review: Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Scleroderma: Effective Immunomodulatory Therapy for Patients With Pulmonary Involvement. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, n. 10, p. 2361–2371, 2016.

SUN, W. et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. **Brain**, v. 127, n. 5, p. 996–1008, 2004.

SWART, J. F. et al. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 244–256, 2017.

SYKES, M.; NIKOLIC, B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 620–627, 2005.

TARHAN, F. et al. Telomerase activity in connective tissue diseases: elevated in rheumatoid arthritis, but markedly decreased in systemic sclerosis. **Rheumatology International**, v. 28, n. 6, p. 579–583, 2008.

THANGAVELU, G. et al. Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis. **Journal of Autoimmunity**, v. 36, n. 3–4, p. 301–312, 2011.

TOUBERT, A. IL-7 earns her ticket in allo-HSCT. **Blood**, v. 120, n. 24, 2012.

TROJANOWSKA, M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 8, p. 453–60, 2010.

TSUKAMOTO, H. et al. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50, n. 5, p. 944–52, 2011.

TYNDALL, A. et al. Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9047, p. 254, 1997.

TYNDALL, A.; GRATWOHL, A. Special report Blood and marrow stem cell transplants in auto-immune disease: a consensus report written on behalf of the European League against Rheumatism (EULAR) and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Bone Marrow Transplantation**, v. 19, p. 643–645, 1997.

TYNDALL, A.; SACCARDI, R. Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. **Clinical and experimental immunology**, v. 141, n. 1, p. 1–9, 2005.

VAN BEKKUM, D. W. et al. Regression of adjuvant-induced arthritis in rats following bone marrow transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 24, p. 10090–4, 1989.

VAN BEKKUM, D. W. Stem cell transplantation in experimental models of autoimmune disease. **Journal of clinical immunology**, v. 20, n. 1, p. 10–16, 2000a.

VAN BEKKUM, D. W. Conditioning regimens for the treatment of experimental arthritis with autologous bone marrow transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 25, n. 4, p. 357–364, 2000b.

VAN BEKKUM, D. W. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. **Journal of leukocyte biology**, v. 72, n. 4, p. 609–20, 2002.

VAN BEKKUM, D. W. Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 32 Suppl 1, p. S37–S39, 2003.

VAN DEN HOOGEN, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2737–2747, 2013.

VAN LAAR, J. M. et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Intravenous Pulse Cyclophosphamide in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. **JAMA**, v. 311, n. 24, p. 2490–2498, 2014.

VONK, M. C. et al. Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 1, p. 98–104, 2008.

WASILEWSKA, A. et al. Interleukin-17 inhibitors. A new era in treatment of psoriasis and other skin diseases. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 33, n. 4, p. 247–52, 2016.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 8, p. 583–594, 2004.

YANABA, K. et al. Serum levels of monocyte chemotactic protein-3/CCL7 are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 1, p. 124–6, 2006.

ZHANG, L. et al. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 10, p. 6346–6358, 2009.

ZHANG, X. et al. Acute response of peripheral blood cell to autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetic patient. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31887, 2012.

Anexos

ANEXO A- LISTA DE PUBLICAÇÕES*Publicações incluídas nessa tese*

- I. **Autologous Hematopoietic Cell Transplants for Autoimmune Diseases: Specific Diseases and Controversies.** Arruda LCM, Oliveira MC, Malmegrim KCR, Gluckman E, Farge D. In Hematopoietic Cell Transplants: Concepts, Controversies and Future Directions (pp. 531-534). Abutalib S (Author) & Lazarus H, Gale R, Keating A, Bacigalupo A, Munker R & Atkinson K (Eds.), Cambridge: Cambridge University Press. 2017. doi:10.1017/9781316335727.058
- II. **Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases.** Arruda LC, Clave E, Moins-Teisserenc H, Douay C, Farge D, Toubert A. *Curr Res Transl Med.* 2016 Apr-Jun;64(2):107-13. doi: 10.1016/j.retram.2016.03.004.
- III. **Evolution of serum cytokine profile after hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients.** Michel L, Farge D, Baraut J, Marjanovic Z, Jean-Louis F, Porcher R, Grigore EI, Deligny C, Romijn F, Arruda LC, van Pelt J, Levarht N, Verrecchia F, van Laar JM. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Aug;51(8):1146-9. doi: 10.1038/bmt.2016.77.
- IV. **Long-term immune reconstitution and T cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients.** Farge D, Arruda LC, Brigant F, Clave E, Douay C, Marjanovic Z, Deligny C, Maki G, Gluckman E, Toubert A, Moins-Teisserenc H. *J Hematol Oncol.* 2017 Jan 19;10(1):21. doi: 10.1186/s13045-016-0388-5.

Publicações não incluídas nessa tese

- I. **Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes.** Malmegrim KC, de Azevedo JT, Arruda LC, Abreu JR, Couri CE, de Oliveira GL, Palma PV, Scortegagna GT, Stracieri AB, Moraes DA, Dias JB, Pieroni F, Cunha R, Guilherme L, Santos NM, Foss MC, Covas DT, Burt RK, Simões BP, Voltarelli JC, Roep BO, Oliveira MC. *Front Immunol.* 2017 Feb 22;8:167. doi: 10.3389/fimmu.2017.00167.
 - II. **Immunological correlates of favorable long-term clinical outcome in multiple sclerosis patients after autologous hematopoietic stem cell transplantation.** Arruda LC, de Azevedo JT, de Oliveira GL, Scortegagna GT, Rodrigues ES, Palma PV, Brum DG, Guerreiro CT, Marques VD, Barreira AA, Covas DT, Simões BP, Voltarelli JC, Oliveira MC, Malmegrim KC. *Clin Immunol.* 2016 Aug;169:47-57. doi: 10.1016/j.clim.2016.06.005.
-

-
- III. Cytokine profile and lymphocyte subsets in type 2 diabetes.** Francisco CO, Catai AM, Moura-Tonello SC, **Arruda LC**, Lopes SL, Benze BG, Del Vale AM, Malmegrim KC, Leal AM. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(4):e5062. doi: 10.1590/1414-431X20155062.
- IV. Transforming growth factor- β increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis.** Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Masse I, Grigore EI, **Arruda LC**, Lamartine J, Verrecchia F, Michel L. *Arthritis Res Ther.* 2015 Jul 31;17:196. doi: 10.1186/s13075-015-0708-0.
- V. Autologous hematopoietic SCT normalizes miR-16, -155 and -142-3p expression in multiple sclerosis patients.** **Arruda LC**, Lorenzi JC, Sousa AP, Zanette DL, Palma PV, Panepucci RA, Brum DS, Barreira AA, Covas DT, Simões BP, Silva WA Jr, Oliveira MC, Malmegrim KC. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Mar;50(3):380-9. doi: 10.1038/bmt.2014.277.
-

ANEXO B- PRÊMIOS ASSOCIADOS A ESSA TESE

- I.** *FOCIS Oral Abstract Presentation Travel Award, Federations of Clinical Immunology Societies, Chicago-IL, EUA. 2017.*
 - II.** *Thereza Kipnis Award, Sociedade Brasileira de Imunologia, Campos do Jordão-SP, Brasil. 2016.*
 - III.** *Posters of Merit, Federations of Clinical Immunology Societies, Boston-MA, EUA. 2016.*
 - IV.** *Primeiro Lugar no concurso de temas livres, XXXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia, Brasília-DF, Brasil. 2016.*
 - V.** *ASH Abstract Achievement Award, American Society of Hematology, San Diego-CA, EUA. 2016.*
 - VI.** *Travel Grant, Annual European Congress of Rheumatology, European League Against Rheumatism, Roma, Itália. 2015.*
 - VII.** *ECI-AAI Travel Grant Award, American Association of Immunologists, European Congress of Immunology, Viena, Áustria. 2015.*
-

ANEXO C- REPERCUSSÃO DESSE TRABALHO

Estudo revela mecanismos imunológicos responsáveis pela cura da esclerose sistêmica

29 de março de 2017

José Tadeu Arantes | Agência FAPESP

– A esclerose sistêmica é uma doença

autoimune caracterizada pelo ataque do sistema imunológico ao tecido conjuntivo. O sintoma mais evidente é a perda de elasticidade e o enrijecimento da pele. Porém, nas formas mais graves, pode ocorrer também a falência das funções renal, pulmonar e cardíaca, levando o paciente a óbito.

O tratamento convencional com drogas imunossupressoras apresenta alta incidência de efeitos colaterais e baixo índice de êxito. A maioria dos pacientes não responde bem, e nos casos mais graves a mortalidade cinco anos após o diagnóstico pode chegar a 50%. Daí o interesse no desenvolvimento de terapias alternativas, como o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. Usando o vocabulário da informática, os estudiosos caracterizam esse procedimento alternativo como um *resetting*. O sistema imunológico é inteiramente “desligado” e, depois, “religado”, para que passe a funcionar adequadamente.

Um estudo, conduzido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), investigou como o transplante é capaz de produzir um novo sistema imunológico. E por que a maioria dos pacientes responde positivamente ao procedimento, mas alguns não. A pesquisa foi realizada pelo doutorando [Lucas Coelho Marlière Arruda](#), sob a orientação da professora [Maria Carolina de Oliveira Rodrigues](#), com apoio da FAPESP: [“Estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com esclerose sistêmica ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas”](#).

Apresentado em congressos nacionais e internacionais, [o estudo](#) recebeu nada menos do que quatro prêmios em 2016: Posters of Merit, das Federations of Clinical Immunology Societies (Boston, EUA); Primeiro Lugar no Concurso de Temas Livres do XXXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia, da Sociedade Brasileira de Reumatologia (Brasília-DF); Thereza Kipnis Award (maior prêmio de imunologia da América Latina para jovens pesquisadores), da Sociedade Brasileira de Imunologia (Campos do Jordão-SP); e ASH Abstract Achievement Award, da American Society of Hematology

(San Diego, EUA).

“Avaliamos dois processos de renovação do sistema imunológico. O primeiro, por meio do timo, responsável pela formação das células T. O segundo, por meio da medula óssea, responsável pela formação das células B. E buscamos entender os diversos mecanismos, celulares e moleculares, envolvidos na nova produção dessas células do sistema imunológico”, resumiu Lucas Coelho Marlière Arruda à **Agência FAPESP**.

“O estudo conduzido por Arruda se insere no programa de transplantes para doenças autoimunes do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Esse tratamento alternativo, adotado também nos Estados Unidos e na Europa, já foi aplicado por nós em cerca de 80 pacientes. Mas, embora tivéssemos muita clareza sobre o procedimento clínico, ainda não possuíamos uma explicação satisfatória para os mecanismos imunológicos envolvidos. Encontrar essa explicação foi o objetivo do estudo”, comentou a orientadora Maria Carolina de Oliveira Rodrigues.

Antes de descrevê-lo, é preciso resumir, primeiro, o passo a passo da terapia baseada no transplante de células-tronco hematopoiéticas.

O transplante alogênico – isto é, com células-tronco de doadores saudáveis – é descartado, pois traz o risco de os pacientes desenvolverem a chamada “doença do enxerto contra hospedeiro” (GVHD, do inglês *graft-versus-host disease*), na qual as células transplantadas atacam tecidos do organismo receptor. Opta-se, então, pelo transplante autólogo, com células-tronco dos próprios pacientes.

A primeira etapa consiste em mobilizar essas células, por meio de diversas medicações, trazendo-as do interior dos ossos para a circulação sanguínea. Na segunda etapa, as células-tronco, que se distinguem pelo fenótipo, são identificadas, coletadas e congeladas. O procedimento é relativamente simples: o paciente fica acoplado à máquina coletora, sem sedação, como em uma transfusão de sangue comum.

Já a terceira etapa é bem mais delicada. Pois, nela, são administradas substâncias imunossupressoras em doses extremamente elevadas, visando deletar por completo todo o sistema imunológico. Para isso, na vigência da imunossupressão, o paciente precisa ficar confinado em um ambiente rigorosamente livre de patógenos, de modo que não haja o menor risco de infecção oportunista, que poderia levá-lo a óbito.

Na quarta etapa, finalmente, as células-tronco hematopoiéticas, previamente congeladas, são reinfundidas no paciente, para que possam voltar a migrar para os ossos e recriar um sistema imunológico saudável. O período total de internação para o transplante é da ordem de 20 dias.

“O objetivo de nosso estudo foi compreender como o timo e a medula óssea são reativados, ou reiniciados, após o transplante. E como isso se relaciona com o êxito ou não da terapia. Para tanto,

colhemos sangue periférico dos pacientes e avaliamos marcadores moleculares de última geração: os TRECs (*T-Cell Receptor Excision Circles*), que informam sobre a atividade do timo; e os KRECs (*Kappa Deleting Recombination Excision Circles*), que informam sobre a atividade da medula”, descreveu Arruda.

Foram avaliados 31 pacientes: no pré-transplante, e, depois, a cada seis meses, até três anos após o transplante. Todos eles vinham tomando medicação imunossupressora há anos, mas sem que esse tratamento convencional impedisse a progressão da doença. Dos 31 pacientes acompanhados, 25 deles, isto é, mais de 80%, responderam bem ao transplante, e não precisaram mais recorrer à terapia convencional. “Neles, verificamos que o timo voltava a funcionar e, principalmente, a produzir células T reguladoras, que tem esse nome exatamente por regular o sistema imune. E também que a medula óssea voltava a produzir células B reguladoras, cuja função é igualmente a de regular o sistema imunológico”, informou Arruda.

“O estudo mostrou que a terapia leva a uma renovação completa do sistema imunológico e não a um simples reparo”, complementou Rodrigues. “O fato de o timo voltar a funcionar é prova disso. Porque, normalmente, o timo é muito ativo na infância; depois, quando o sistema imunológico já está constituído, torna-se inativo. O fato de voltar a funcionar, e até de aumentar de tamanho, sinaliza um processo de reconstrução do sistema imunológico.”

“Outra evidência é a mudança no repertório das células T. As novas células param de atacar o paciente e passam a atuar apenas na proteção do organismo contra agentes patogênicos, como deve ser. A terceira evidência é o expressivo aumento numérico e a maior atuação das células T reguladoras, que são fundamentais para o bom funcionamento do sistema imunológico. Mas a maior novidade trazida pelo estudo de Arruda foi a renovação também das células B”, prosseguiu a orientadora.

Nos seis pacientes que não responderam bem à terapia, essas respostas imunológicas tiveram início, mas não se sustentaram. A explicação é que, nesses casos, as células doentes não foram inteiramente eliminadas. Parte delas sobreviveu ao transplante, e, depois, voltou a se multiplicar e a agredir o tecido conjuntivo. “É importante notar, porém, que mesmo esses pacientes obtiveram um saldo positivo. Pois, antes, não respondiam bem à terapia convencional. E, após o transplante, passaram a responder”, ponderou Arruda.

A esclerose sistêmica acomete principalmente mulheres, na faixa dos 30 aos 55 anos. Trata-se de uma doença multifatorial, cujas causas envolvem tanto fatores genéticos quanto ambientais (estilo de vida, atividade profissional, alimentação, uso de medicamentos etc.).

[\(http://ctcusp.org/\)](http://ctcusp.org/)

Pesquisa sobre esclerose sistêmica desenvolvida no CTC vence o maior prêmio de imunologia da América Latina

O pesquisador Lucas Arruda recebeu o "Prêmio Thereza Kipnis 2016" pelo trabalho sobre esclerose sistêmica desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CTC) da USP. O certificado foi entregue no XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, realizado em Campos do Jordão do dia 29/10 a 02/11. O primeiro lugar foi dividido com a pesquisadora Denise Moraes da Fonseca, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

(<http://ctcusp.org/wp-content/uploads/2016/11/Thereza-Kipnis-2.jpg>)

O artigo "Linfócitos B e T reguladores recém-gerados após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas associam-se a melhora da fibrose cutânea em pacientes com esclerose sistêmica", também venceu este ano o concurso de temas livres do XXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia.

O estudo foi conduzido com a colaboração de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP, do Hemocentro de Ribeirão Preto e da Universidade Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, da França.

Clique no link abaixo e saiba mais sobre a pesquisa.

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune reumática crônica do tecido conjuntivo, caracterizada por lesões microvasculares associadas a diferentes graus de fibrose da pele e dos órgãos internos. As causas permanecem ainda desconhecidas, por isso, os tratamentos disponíveis possuem uma eficácia limitada no controle da progressão da doença e os pacientes sofrem com problemas de falta de ar, dores pelo corpo, manchas e dificuldade de locomoção, levando muitos doentes a deixarem seus trabalhos e o convívio familiar.

Segundo o pesquisador Lucas Coelho Marlière Arruda, um dos autores do projeto, as opções de tratamento convencionais não funcionam muito bem, assim, o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas tem surgido como uma alternativa terapêutica promissora, impedindo a progressão da doença e devolvendo qualidade de vida.

"A terapia envolve o uso de altas doses de quimioterapia, com o objetivo de destruir por completo o sistema imunológico doente, seguido pela administração das células-tronco do próprio paciente para 'resetar' o sistema imune e impedir a progressão da doença. Funciona como o 'reset' de um computador defeituoso, para que ele volte a funcionar bem novamente", explica Arruda.

O objetivo do grupo foi avaliar como a reconstituição do novo sistema imunológico, após o "reset", está relacionada com a melhora clínica dos pacientes. Para isso, 31 doentes foram acompanhados por três anos para a descrição completa das mudanças ocorridas.

Os resultados apontaram que o timo e a medula óssea, órgãos responsáveis pela manutenção das células do sangue e do sistema imune, produzem muitas células reguladoras, após a terapia com as células-tronco. Também foi notado a melhora da fibrose da pele e dos órgãos internos, levando ao controle da doença por gerar um sistema imune mais saudável.

A pesquisa ajuda a esclarecer os mecanismos imunológicos de ação e os benefícios do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica, o que é necessário para melhoria do protocolo clínico e a consolidação desta terapia como tratamento da doença.

Confira abaixo a entrevista para a TV Hemocentro.

(<http://ctcusp.org/wp-content/uploads/2016/11/Lucas-Coelho.jpg>)

Lucas Arruda

Social

Search

Agendamento Bioinformática

Agendar (http://ctcusp.org/?page_id=3363)

Informação para pacientes

Pacientes: clique aqui (http://ctcusp.org/?page_id=3227)

This entry was posted in Notícias (<http://ctcusp.org/?cat=41>). Bookmark the permalink (<http://ctcusp.org/?p=4235>).

← INCT em Células-Tronco e Terapia Celular no Câncer é aprovado pelo MCTI (<http://ctcusp.org/?p=4222>)
 Jornada aborda tópicos avançados em biologia e biotecnologia do desenvolvimento animal →
 (<http://ctcusp.org/?p=4247>)

Suport

(<http://www.hemocentro.fmrp.usp.br/projeto/index.htm>)

(<http://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/>)

(http://www.fmrp.usp.br/novo_portal/)

(<http://www5.usp.br/>)

(<http://www.fapesp.br/>)

(<http://www.cnpq.br/>)

(http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_en/)

(<http://www.finep.gov.br/>)

(<http://www.mct.gov.br/>)

Institutions

Institutions (http://ctcusp.org/?page_id=2834)

Contact

Contact (http://ctcusp.org/?page_id=3247)

Jornal da USP

CIÊNCIAS | CULTURA | ATUALIDADES | UNIVERSIDADE | INSTITUCIONAL

» Home > Ciências > Ciências Biológicas > Pesquisador da USP vence o maior prêmio de imunologia da América Latina

Ciências Biológicas - 04/11/2016

Pesquisador da USP vence o maior prêmio de imunologia da América Latina

Lucas Arruda recebeu o Prêmio Thereza Kipnis 2016 por sua pesquisa sobre esclerose sistêmica

Por Redação - Editorias: Ciências Biológicas, Ciências da Saúde

O pesquisador Lucas Coelho Marlière Arruda foi o vencedor do Prêmio Thereza Kipnis 2016 devido à sua pesquisa sobre esclerose sistêmica, desenvolvida no Centro de Terapia Celular (CTC) da USP. O prêmio, que foi dividido com a jovem pesquisadora Denise Moraes da Fonseca do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, foi entregue no *Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia*, realizado em Campos do Jordão de 29 de outubro a 2 de novembro.

O artigo *Linfócitos B e T reguladores recém-gerados após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas associam-se a melhora da fibrose cutânea em pacientes com esclerose sistêmica* também venceu este ano o concurso de temas livres do *Congresso Brasileiro de Reumatologia*.

O estudo foi conduzido com a colaboração de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP, do Hemocentro de Ribeirão Preto e da Universidade Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, da França.

Mais informações: site <http://ctcusp.org/?p=4235>.

Textos relacionados

Sucesso da terapia celular contra diabetes depende da condição imune

Linhas de pesquisas da USP geraram remédios para hipertensão

Ações judiciais custaram R\$ 1,2 bilhão ao Ministério da Saúde em 2016

Composto com ouro inibe sobrevivência de parasita que causa Chagas

Cuidados com a voz

Exercício é mais efetivo que dieta contra osteoporose na menopausa

Acontece na USP

Hoje | Próximos eventos

04/05/2017

Segurança no Trabalho e do Paciente tema de fórum na Faculdade de Saúde Pública

04/05/2017

Ciranda do Tempo é tema de simpósio sobre pediatria

04/05/2017

Preservação cultural é tema de palestra na Faculdade de Arquitetura e Urbanismo

04/05/2017

USP oferece curso sobre a obra literária e crítica de Elena Ferrante

04/05/2017

Governança Universitária em Tempos de Crise é tema de seminário na USP

» Todos os eventos

Artigos

Governança universitária: lições e desafios

03/05/2017

Eliseu Martins é Professor Emérito da Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade

Barnabé, o funcionário

28/04/2017

José Geraldo Vinci de Moraes é professor do Departamento de História

[\(http://ctcusp.org/\)](http://ctcusp.org/)

Pesquisa premiada em congresso de reumatologia aponta nova alternativa para o tratamento da esclerose sistêmica

Um trabalho inédito, desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CTC) da USP, conquistou o primeiro lugar no concurso de temas livres do XXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia, realizado este ano em Brasília, do dia 24 a 27 de agosto.

O título do artigo é "Linfócitos B e T reguladores recém-gerados após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas associam-se a melhora da fibrose cutânea em pacientes com esclerose sistêmica".

O estudo foi conduzido por pesquisadores do CTC, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP, do Hemocentro de Ribeirão Preto e da Universidade Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, da França.

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune reumática crônica do tecido conjuntivo, caracterizada por lesões microvasculares associadas a diferentes graus de fibrose da pele e dos órgãos internos. As causas permanecem ainda desconhecidas, por isso, os tratamentos disponíveis possuem uma eficácia limitada no controle da progressão da doença e os pacientes sofrem com problemas de falta de ar, dores pelo corpo, manchas e dificuldade de locomoção, levando muitos doentes a deixarem seus trabalhos e o convívio familiar.

Segundo o pesquisador Lucas Coelho Marlière Arruda, um dos autores do projeto, as opções de tratamento convencionais não funcionam muito bem, assim, o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas tem surgido como uma alternativa terapêutica promissora, impedindo a progressão da doença e devolvendo qualidade de vida.

"A terapia envolve o uso de altas doses de quimioterapia, com o objetivo de destruir por completo o sistema imunológico doente, seguido pela administração das células-tronco do próprio paciente para 'resetar' o sistema imune e impedir a progressão da doença. Funciona como o 'reset' de um computador defeituoso, para que ele volte a funcionar bem novamente", explica Arruda.

O objetivo do grupo foi avaliar como a reconstituição do novo sistema imunológico, após o "reset", está relacionada com a melhora clínica dos pacientes. Para isso, 31 doentes foram acompanhados por três anos para a descrição completa das mudanças ocorridas.

Os resultados apontaram que o timo e a medula óssea, órgãos responsáveis pela manutenção das células do sangue e do sistema imune, produzem muitas células reguladoras, após a terapia com as células-tronco. Também foi notado a melhora da fibrose da pele e dos órgãos internos, levando ao controle da doença por gerar um sistema imune mais saudável.

A pesquisa ajuda a esclarecer os mecanismos imunológicos de ação e os benefícios do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica, o que é necessário para melhoria do protocolo clínico e a consolidação desta terapia como tratamento da doença.

Confira abaixo a entrevista para a TV Hemocentro.

Social

Search

Agendamento Bioinformática

Agendar (http://ctcusp.org/?page_id=3363)

Informação para pacientes

Pacientes: clique aqui (http://ctcusp.org/?page_id=3227)

This entry was posted in Notícias (<http://ctcusp.org/?cat=41>). Bookmark the permalink (<http://ctcusp.org/?p=4099>).

← Seminário do Centro de Terapia Celular aborda a "Biologia dos Telômeros" (<http://ctcusp.org/?p=4097>)
 Pesquisadora do CTC lança versão internacional de livro sobre células-tronco → (<http://ctcusp.org/?p=4101>)

Suport

Hemocentro RP

(<http://www.hemocentro.fmrp.usp.br/projeto/index.htm>)

(<http://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/>)

(http://www.fmrp.usp.br/novo_portal/)

(<http://www5.usp.br/>)

(<http://www.fapesp.br/>)

(<http://www.cnpq.br/>)

(http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_en/)

(<http://www.finep.gov.br/>)

(<http://www.mct.gov.br/>)

Institutions

Institutions (http://ctcusp.org/?page_id=2834)

Contact

Contact (http://ctcusp.org/?page_id=3247)

Jornal da USP

CIÊNCIAS | CULTURA | ATUALIDADES | UNIVERSIDADE | INSTITUCIONAL

» Home > Ciências > Ciências da Saúde > Transplante de células-tronco é eficaz no tratamento da esclerose sistêmica

Ciências da Saúde - 07/09/2016

Transplante de células-tronco é eficaz no tratamento da esclerose sistêmica

Estudo realizado no Centro de Terapia Celular comprova eficiência do transplante autólogo de células-tronco no tratamento da doença autoimune

Por Redação - Editorias: Ciências da Saúde

Pesquisa realizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP e Universidade Paris Diderot, de Sorbonne Paris Cité, França, comprova benefícios do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (realizado com células do sangue do próprio doente) no tratamento da esclerose sistêmica.

Célula tronco humana – Foto: King's College London/Flickr-CC

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune reumática crônica do tecido conjuntivo (um dos tipos de tecidos encontrados no corpo humano) e “caracterizada por lesões microvasculares associadas a diferentes graus de fibrose da pele e dos órgãos internos”, como explica o pesquisador Lucas Coelho Marlière Arruda, da FMRP.

As causas permanecem desconhecidas, por isso os tratamentos disponíveis possuem eficácia limitada no controle da progressão da doença. Os pacientes sofrem com problemas de falta de ar, dores pelo corpo, manchas e dificuldade de locomoção. Muitos são obrigados a deixar a vida profissional e até o convívio familiar.

Como as opções de tratamento até o momento utilizadas não funcionam muito bem, “o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas surge como uma alternativa terapêutica promissora, impedindo a progressão da doença e devolvendo qualidade de vida”, destaca Arruda.

Na terapia, os pacientes se submetem a altas doses de quimioterapia. O objetivo é destruir por completo o sistema imunológico doente e, em seguida, administrar células-tronco do próprio paciente para “resetar” o sistema imune e impedir a progressão da doença. “Funciona como o *reset* de um computador defeituoso, para que ele volte a funcionar bem novamente”, simplifica o cientista.

Pós-transplante

Os pesquisadores franceses e do Centro de Terapia Celular (CTC) da FMRP – um dos Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepids) da Fapesp – acompanharam 31 pacientes pós-transplantados durante três anos para descrição completa das mudanças ocorridas. Queriam avaliar como a reconstituição do novo sistema imunológico, após o *reset*, está relacionada com a melhora clínica dos pacientes.

Os resultados apontaram que o timo e a medula óssea, órgãos responsáveis pela manutenção das células do

Acontece na USP

Hoje | Próximos eventos

04/05/2017

Segurança no Trabalho e do Paciente tema de fórum na Faculdade de Saúde Pública

04/05/2017

Ciranda do Tempo é tema de simpósio sobre pediatria

04/05/2017

Preservação cultural é tema de palestra na Faculdade de Arquitetura e Urbanismo

04/05/2017

USP oferece curso sobre a obra literária e crítica de Elena Ferrante

04/05/2017

Governança Universitária em Tempos de Crise é tema de seminário na USP

» Todos os eventos

Artigos

Governança universitária: lições e desafios

03/05/2017

Eliseu Martins é Professor Emérito Faculdade de Economia, Administração e Contábil

Barnabé, o funcionário

28/04/2017

José Geraldo Vinci de Moraes é professor do Departamento de ...

sangue e do sistema imune, produzem muitas células reguladoras após a terapia com as células-tronco. Também notaram a melhora da fibrose da pele e dos órgãos internos, levando ao controle da doença por gerar um sistema imune mais saudável.

A pesquisa ajuda a esclarecer os mecanismos imunológicos de ação e os benefícios do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica, o que é necessário para melhoria do protocolo clínico e a consolidação desta terapia como tratamento da doença.

Inédito, o estudo *Linfócitos B e T reguladores recém-gerados após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas associam-se a melhora da fibrose cutânea em pacientes com esclerose sistêmica* conquistou o primeiro lugar no concurso de temas livres do XXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia, realizado este ano em Brasília, entre os dias 24 e 27 de agosto.

Eduardo Loria Vidal/CTC

Mais informações: (16) 2101-9350

Lucas Coelho Marlière Arruda –
Foto: Arquivo pessoal

O processo de validação do conhecimento científico

24/04/2017

Lia Queiroz do Amaral é professora aposentada do Instituto ...

A educação: de Mori a Ercília

18/04/2017

Julio Groppa Aquino é professor de FEUSP

O revisor entre o sagrado e o profano

12/04/2017

Jurandir Renovato é escritor, crítico de literatura, revisor e editor-executivo

Textos relacionados

Sucesso da terapia celular contra diabetes depende da condição imune

Ações judiciais custaram R\$ 1,2 bilhão ao Ministério da Saúde em 2016

Composto com ouro inibe sobrevivência de parasita que causa Chagas

Cuidados com a voz

Exercício é mais efetivo que dieta contra osteoporose na menopausa

Identificado mecanismo que reduz imunidade após infecção generalizada

CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N Ribeirão Preto - SP- CEP 14048-900
(16) 3602-1000
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Faça aqui uma busca

HC em um Clique..

INSTITUCIONAL

ASSISTÊNCIA

ENSINO

PESQUISA

UNIDADE DE
EMERGÊNCIAINFORMAÇÃO
AO PACIENTEINFORMAÇÃO
EM SAÚDE

CONCURSOS

LICITAÇÕES

Hospital das Clínicas

Institucional

Administração

HCRP

FAEPA

Localização

Notícias

Eventos

Segurança do Paciente

Acesso à Informação

09/set/2016

Tamanho da fonte: A+ A-

Pesquisa premiada em congresso

Pesquisa premiada em congresso de reumatologia aponta nova alternativa para o tratamento da esclerose sistêmica

[confira a galeria](#)

Um trabalho inédito, desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CTC) da USP, conquistou o primeiro lugar no concurso de temas livres do XXIII Congresso Brasileiro de Reumatologia, realizado este ano em Brasília, do dia 24 a 27 de agosto.

O título do artigo é "Linfócitos B e T reguladores recém-gerados após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas associam-se a melhora da fibrose cutânea em pacientes com esclerose sistêmica".

O estudo foi conduzido por pesquisadores do CTC, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP, do Hemocentro de Ribeirão Preto e da Universidade Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, da França.

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune reumática crônica do tecido conjuntivo, caracterizada por lesões microvasculares associadas a diferentes graus de fibrose da pele e dos órgãos internos. As causas permanecem ainda

desconhecidas, por isso, os tratamentos disponíveis possuem uma eficácia limitada no controle da progressão da doença e os pacientes sofrem com problemas de falta de ar, dores pelo corpo, manchas e dificuldade de locomoção, levando muitos doentes a deixarem seus trabalhos e o convívio familiar.

Segundo o pesquisador Lucas Coelho Marlière Arruda, um dos autores do projeto, as opções de tratamento convencionais não funcionam muito bem, assim, o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas tem surgido como uma alternativa terapêutica promissora, impedindo a progressão da doença e devolvendo qualidade de vida.

"A terapia envolve o uso de altas doses de quimioterapia, com o objetivo de destruir por completo o sistema imunológico doente, seguido pela administração das células-tronco do próprio pacientes para 'resetar' o sistema imune e impedir a progressão da doença. Funciona como o 'reset' de um computador defeituoso, para que ele volte a funcionar bem novamente", explica Arruda.

O objetivo do grupo foi avaliar como a reconstituição do novo sistema imunológico, após o 'resetar', está relacionada com a melhora clínica dos pacientes. Para isso, 31 doentes foram acompanhados por três anos para a descrição completa das mudanças ocorridas.

Os resultados apontaram que o timo e a medula óssea, órgãos responsáveis pela manutenção das células do sangue e do sistema imune, produzem muitas células reguladoras, após a terapia com as células-tronco. Também foi notado a melhora da fibrose da pele e dos órgãos internos, levando ao controle da doença por gerar um sistema imune mais saudável.

A pesquisa ajuda a esclarecer os mecanismos imunológicos de ação e os benefícios do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas no tratamento da esclerose sistêmica, o que é necessário para melhoria do protocolo clínico e a consolidação desta terapia como tratamento da doença.

Fale Conosco : Como Chegar : Webmail : Extranet :

Acesso à
Informação

© Copyright Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.