

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**GIOCONDA MUNIZ FIORENZA RUGGIO**

**EFEITO DE FRAÇÃO PROTEOLÍTICA DO LÁTEX DE**  
***Vasconcellea cundinamarcensis* NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA**  
**ASSOCIADA À DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO (DECH)**  
**MURINA.**

Belo Horizonte  
2025

GIOCONDA MUNIZ FIORENZA RUGGIO

**EFEITO DE FRAÇÃO PROTEOLÍTICA DO LÁTEX DE**  
***Vasconcellea cundinamarcensis* NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA**  
**ASSOCIADA À DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO (DECH)**  
**MURINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gomes  
Miranda e Castor Romero

Coorientadora: Miriam Teresa Paz Lopes

Belo Horizonte  
2025

043

Ruggio, Gioconda Muniz Fiorenza.

Efeito de fração proteolítica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* na resposta inflamatória associada à doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH) murina [manuscrito] / Gioconda Muniz Fiorenza Ruggio. – 2025. 121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor Romero.

Coorientadora: Miriam Teresa Paz Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. 3. Inflamação. 4. Linfócitos T. 5. Doença Enxerto-Hospedeiro. I. Romero, Marina Gomes Miranda e Castor. II. Lopes, Miriam Teresa Paz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612-615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Efeito da Fração Proteolítica do Lítex de *Miconia acuminata* na Resposta Inflamatória Associada À Doença do Erveto-contrá-hospedeiro (DECH) Murina"**

**GIOCONDA MUNIZ FIORENZA RUGGIO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 14 de maio de 2025, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castro Romero - Orientadora - ICB/UFMG

Profa. Dra. Miriam Tereza Paz Lopes, Coorientadora - ICB/UFMG

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes - ICB/UFMG

Prof. Dr. André Klein - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 14 de maio de 2025



Documento assinado eletronicamente por Marina Gomes Miranda e Castro Romero, Professora do Magistério Superior, em 06/06/2025, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior, em 06/06/2025, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Miriam Tereza Paz Lopes, Professora do Magistério Superior, em 09/06/2025, às 15:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por André Klein, Professor do Magistério Superior, em 13/06/2025, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

*A Jesus Cristo, o maior mestre.*

## **Agradecimentos**

Agradeço, a Deus, ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, o maior Mestre entre todos, por quem carrego profundo amor, e reconheço sua soberania sobre céus e terra. Sem Ele eu jamais teria chegado até aqui.

Agradeço, aos meus pais, Valdete e Paulo Ruggio, por investirem na minha educação, por acreditarem nos meus sonhos e nunca terem abandonado o papel de pais com dedicação incondicional ao bem-estar dos filhos. Ao meu namorado, Júlio Cesar Amaral o incentivo diário, por momentos de felicidade, que fizeram muita diferença durante o caminho.

À professora Marina, por quem carrego profunda admiração, por características pessoais e profissionais. Agradeço a oportunidade de fazer parte do laboratório e por todos os ensinamentos transferidos.

À professora Miriam Lopes, coorientadora neste trabalho, sem a sua contribuição ele não teria a excelência de agora.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Zara, Fabrício, Aline e Lindsay, pelo convívio prazeroso durante esses dois últimos anos e as contribuições para a conclusão deste trabalho. Às ICs Marcela e Estela que muito auxiliaram para a construção dessa pesquisa.

Um agradecimento especial a Ana Flavia Linhares, amiga de laboratório, por me ensinar tantas vezes com zelo e paciência, além dos momentos alegres que compartilhamos.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia por cada ensinamento. Ao professor Stêfany por todas as explicações didáticas excepcionais. Aos professores Mauro Teixeira, Vanessa Pinho e Thiago Romero, sem as suas devidas contribuições, o trabalho não teria a mesma qualidade.

Por fim, gostaria de agradecer às agências de fomento que colaboraram com este projeto, FAPEMIG, CAPES, CNPQ e a Fernanda Trindade Madeira Araújo do Instituto René Rachou/ Fundação Oswaldo Cruz por ceder camundongos para os experimentos.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.”

Issac Newton

## RESUMO

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH-alo) é uma estratégia terapêutica amplamente empregada no tratamento de doenças hematológicas e não hematológicas. Todavia, seu sucesso clínico é frequentemente limitado por desenvolvimento da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH), uma complicação imunomediada que ocorre quando linfócitos T do enxerto reconhecem antígenos do hospedeiro como não-próprios, promovendo ativação, proliferação e infiltração celular em órgãos-alvo como pele, intestino e fígado. Aproximadamente 40% dos pacientes apresentam resistência à terapia convencional com corticosteroides, representando um desafio para o manejo da DECH e impactando diretamente a eficácia do TCTH. Diante desse cenário, investigamos o potencial terapêutico da fração proteolítica P1G10, derivada do látex de *Vasconcella cundinamarcensis*, a qual apresenta propriedades anti-inflamatórias e antitumorais descritas em diversos modelos experimentais. Proteases vegetais como a P1G10 têm sido amplamente estudadas por sua capacidade de modular respostas imunes exacerbadas. Utilizando um modelo murino de DECH aguda, induzido pelo transplante de células da medula óssea e esplenócitos de camundongos Balb/c para receptores C57BL/6J, avaliamos os efeitos da P1G10, administrada na dose de 0,3 mg/kg, sobre a resposta inflamatória da DECH. Como grupo controle, foram utilizados camundongos que receberam células da medula óssea e esplenócitos de doadores singênicos Balb/c, os quais não desenvolveram a doença. O tratamento com P1G10 promoveu redução dos níveis de TNF- $\alpha$  no intestino e de IFN- $\gamma$  no intestino, fígado e soro, além de diminuir a expressão das quimiocinas inflamatórias CCL2 e CCL3 no intestino e soro. A análise por citometria de fluxo, realizada no baço, intestino e fígado, revelou modulação distinta nas populações de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T reguladoras (Tregs) e macrófagos, indicando uma ação imunorreguladora órgão-específica. Adicionalmente, a P1G10 preservou de forma expressiva a integridade da barreira intestinal, prevenindo a translocação bacteriana e mantendo a população de células caliciformes no cólon. No modelo experimental de enxerto-contra-leucemia (ECL), a P1G10 não interferiu na atividade antitumoral do enxerto, evidenciando sua seletividade terapêutica. Esses resultados posicionam a P1G10 como uma abordagem promissora para o tratamento da DECH refratária, associando efeitos imunomoduladores, proteção da mucosa intestinal e manutenção da ação antileucêmica.

**Palavras-chave:** transplante de células tronco hematopoiético (TCTH), DECH, inflamação, mediadores inflamatórios, modulação inflamatória, células T, P1G10, anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a therapeutic strategy widely used in the treatment of hematological and non-hematological diseases. However, its clinical success is often limited by the development of graft-versus-host disease (GVHD), an immune-mediated complication that occurs when graft T lymphocytes recognize host antigens as non-self, promoting cell activation, proliferation and infiltration in target organs such as the intestine, liver and skin. Approximately 40% of patients are resistant to conventional corticosteroid therapy, representing a significant challenge for the management of GVHD and directly impacting the efficacy of HSCT. Given this scenario, we investigated the therapeutic potential of the proteolytic fraction P1G10, derived from the latex of *Vasconcella cundinamarzensis*, which has anti-inflammatory and anti-tumor properties described in various experimental models. Plant proteases such as P1G10 have been widely studied for their ability to modulate exacerbated immune responses. Using a murine model of acute GVHD, induced by transplanting bone marrow cells and splenocytes from Balb/c mice into C57BL/6J recipients, we evaluated the effects of P1G10, administered at a dose of 0.3 mg/kg, on the exacerbated inflammatory response characteristic of GVHD. Mice that received bone marrow cells and splenocytes were used as a control group who did not develop the disease. Treatment with P1G10 reduced TNF- $\alpha$  levels in the intestine and IFN- $\gamma$  levels in the intestine, liver and serum, as well as decreasing the expression of the inflammatory chemokines CCL2 and CCL3 in the intestine and serum. Flow cytometry analysis, carried out on the spleen, intestine and liver, revealed distinct modulation in the populations of CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, regulatory T cells (Tregs) and macrophages, indicating an organ-specific immunoregulatory action. In addition, P1G10 significantly preserved the integrity of the intestinal barrier, preventing bacterial translocation and maintaining the goblet cell population in the colon. In the experimental graft-versus-leukemia (GVL) model, P1G10 did not interfere with the anti-tumor activity of the graft, demonstrating its therapeutic selectivity. These results position P1G10 as a promising approach for the treatment of refractory GVHD, combining immunomodulatory effects, protection of the intestinal mucosa and maintenance of antileukemic action.

**Keywords:** hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), GVHD, inflammation, inflammatory mediators, T cells, P1G10, anti-inflammatory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da fisiopatologia da DECH .....	21
Figura 2 – A espécie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> .....	27
Figura 3 – A fração de cisteína proteases liofilizada .....	34
Figura 4 – Indução da Doença do enxerto-contra-hospedeiro. ....	35
Figura 5 – Processamento do baço para o TCTH. ....	35
Figura 6 – Processamento da medula para o TCTH. ....	36
Figura 7 – Células do baço e medula após centrifugação.....	36
Figura 8 – Representação dos grupos experimentais utilizados .....	38
Figura 9 – Representação da linha da tempo do tratamento .....	39
Figura 10 – Representação do experimento intravital nos vasos mesentéricos do intestino.....	42
Figura 11 – Representação do ELISA sanduíche.....	43
Figura 12 – Representação da curva padrão de ELISA .....	43
Figura 13 – Representação da confecção das lâminas e análise das secções de jejuno-íleo. ....	45
Figura 14 – Representação da análise das secções de fígado. ....	46
Figura 15 – Representação do epitélio do jejuno-íleo e do cólon com células caliciformes.....	47
Figura 16 – Representação da perturbação do epitélio intestinal.....	48
Figura 17 – Placa das amostras do experimento de permeabilidade intestinal e esquema experimental.....	49
Figura 18 – Representação dos grupos utilizados no experimento enxerto contra leucemia.....	50
Figura 19 – Evolução dos parâmetros clínicos do grupo controle e DECH.....	53
Figura 20 – Área sob a curva do experimento dose-resposta .....	53
Figura 21 – Variação de peso do experimento dose-resposta .....	54
Figura 22 – Sobrevida do experimento dose-resposta. ....	55
Figura 23 – Análise morfométrica do baço .....	57
Figura 24 – Citometria do baço- frequência de células T CD4 <sup>+</sup> .....	57
Figura 25 – Citometria do baço- frequência de células T CD8 <sup>+</sup> .....	58
Figura 26 – Citometria do baço- frequência de células T helper. ....	59

Figura 27 – Citometria do baço- frequência de macrófagos.....	60
Figura 28 – Análise do recrutamento leucocitário por intravital no mesentério intestinal.....	61
Figura 29 – Citometria do jejuno-íleo- frequência de células T CD4 <sup>+</sup> .....	62
Figura 30 – Citometria do jejuno-íleo- frequência de células T CD8 <sup>+</sup> .....	63
Figura 31 – Citometria do jejuno-íleo- frequência de células T regs .....	64
Figura 32 – Citometria do jejuno-íleo- frequência de macrófagos .....	65
Figura 33 – Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 no jejuno-íleo por o de ELISA.....	67
Figura 34 –Citometria do fígado- frequência de células T CD4 <sup>+</sup> .....	68
Figura 35 – Citometria do fígado- frequência de células T CD8 <sup>+</sup> .....	68
Figura 36 – Citometria do fígado- frequência de células T regs.....	69
Figura 37 – Citometria do fígado- frequência de macrófagos .....	71
Figura 38 – Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 no fígado por ELISA.....	72
Figura 39 – Imagens histológicas comparativas dos danos teciduais no jejuno-íleo .....	73
Figura 40 – Imagens histológicas comparativas dos danos teciduais no cólon .....	74
Figura 41 – Imagens histológicas comparativas dos danos teciduais no fígado. ....	74
Figura 42 – Análise histológica comparativa dos danos teciduais no jejuno-íleo, cólon e fígado.	
Figura 43– Imagens de análise por método PAS no cólon .....	75
Figura 44 – Quantificação de células caliciformes por coloração PAS no intestino e cólon .....	76
Figura 45 – Análise morfométrica do cólon .....	77
Figura 46 – Análise da translocação de bactérias .....	77
Figura 47 – Placas de plantio microbiológico dos animais DECH+PBS .....	79
Figura 48 – Placas de plantio microbiológico dos animais DECH+P1G10 .....	80
Figura 49 – Fotos de lâminas histológicas dos animais DECH+PBS e DECH+P1G10 .....	81

Figura 50 – Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 no soro por ELISA.....	82
Figura 51- Permeabilidade intestinal .....	83
Figura 52- Efeito enxerto-contra-leucemia (ECL).....	84
Apêndice A.....	117

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1–Escala de pontuação escore clínico .....	37
Tabela 2– Painéis de anticorpos utilizados nas citometrias .....	41
Tabela 3– Lote e fabricação dos anticorpos utilizados no ELISA.....	43
Tabela 4– Critérios histológicos avaliativos de jejuno-íleo .....	44
Tabela 5– Critérios histológicos avaliativos de fígado .....	46

## LISTA DE SIGLAS

- APCs** – Células apresentadoras de antígenos
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CCL2** – Ligante de quimiocina 2
- CCL3** – Ligante de quimiocina 3
- CCL5** – Ligante de quimiocina 5
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CTLs** – Linfócitos T citotóxicos
- DAMPs** – Padrões Moleculares Associados à Danos
- DECH** – Doença do Enxerto-contra-Hospedeiro
- DECHa** – Doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
- DECHc** – Doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica
- ECL** – Enxerto-contra-Leucemia
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática ou Enzyme-linked immunosorbent assay
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína
- GVL** – *Graft-versus-Leukemia*
- GVHD** – *Graft-versus-host disease*
- HLA** – Antígeno leucocitário humano
- H2-Dd** – Complexo principal de histocompatibilidade classe I
- IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 beta
- IL-6** – Interleucina-6
- IL-10** – Interleucina-10
- IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- MHC** – complexo principal de histocompatibilidade
- NK** – Células Natural killer ou células assassinas
- PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- PBS** – Tampão fosfato salina
- PerCp** – Complexo peridininina-clorofila-proteína
- PFA 4%** – Paraformaldeído a 4%
- RPM** – Rotações por minuto
- RPMI 1640** – Meio 1640 desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
- ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- UFC** – Unidade formadora de colônia

**TBS** – Solução Salina Tamponada Tris

**TCTH** – Transplante de células-tronco hematopoiética

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1    TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.	17
1.2    DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO (DECH) .....	19
1.2.1. Fisiopatologia da doença do enxerto-contrahospedeiro aguda.....	19
1.3    A IMPORTÂNCIA DA REAÇÃO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA PARA A EFICIÊNCIA DO TCTH.....	22
<b>1.4 DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA NO INTESTINO .....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Doença do enxerto-contrahospedeiro aguda no fígado .....	23
1.5    TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA A DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO .....	24
1.6    A ESPÉCIE <i>VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS</i> .....	25
1.6.1 Fração proteolítica P1G10 rica em cisteíno proteases .....	27
1.6.2. Características farmacocinéticas e aspectos toxicológicos da P1G10 .....	27
1.6.3. Ação da fração proteolítica P1G10 em diferentes modelos experimentais: perspectivas na modulação inflamatória .....	28
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1    OBJETIVO GERAL .....	32
3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>

4.1. ANIMAIS .....	33
4.2. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO P1G10 .....	33
4.3. INDUÇÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO .....	34
4.4. ESCOLHA DAS DOSES TESTADAS DE P1G10 .....	36
4.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS.....	37
4.6. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
4.7. TRATAMENTOS UTILIZADOS.....	38
4.8 CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
4.9. ANÁLISE DO RECRUTAMENTO CELULAR POR MICROSCOPIA INTRAVITAL .....	41
4.10. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA 42	
4.11. ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS .....	44
4.12. ANÁLISE DAS CÉLULAS CALICIFORMES DO JEJUNO-ÍLEO E CÓLON POR COLORAÇÃO PAS.....	46
4.13. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA .....	48
4.14. PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	49
4.15. RESPOSTA DO ENXERTO CONTRA LEUCEMIA (ECL ou GVL).50	
4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1. EFEITO DA P1G10 NA ESCALA CLÍNICA DE CAMUNDONGOS COM DECH .....	52
5.2 EFEITO DA P1G10 SOBRE A VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS	

COM DECH .....	53
5.3. EFEITO DA P1G10 NA SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS COM DECH.....	54
5.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T NO BAÇO DE CAMUNDONGOS COM DECH.....	55
5.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO BAÇO DE CAMUNDONGOS COM DECH.....	59
5.6. EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 SOBRE O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PARA O INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM DECH .....	61
5.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T DO INTESTINO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CAMUNDONGOS COM DECH....	61
5.8. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO INTESTINO POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	65
5.9. EFEITO DA P1G10 NOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO JEJUNO-ÍLEO DE CAMUNDONGOS COM DECH.....	66
5.10. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM DECH POR CITOMETRIA DE FLUXO..	67
5.11. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM DECH POR CITOMETRIA DE FLUXO..	70
5.12. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO FÍGADO DE ANIMAIS COM DECH. ....	72
5.13. EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 SOBRE A LESÃO INTESTINAL E HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS COM DECH..	73
5.14. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO COLON DE ANIMAIS COM DECH.....	75
5.15. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES NO JEJUNO-	

ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS COM DECH .....	76
5.16. AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA-EIXO- INTESTINO, CAVIDADE PERITONIAL, FÍGADO E CORRENTE SANGUÍNEA .....	77
5.17. EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 NOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS NA CIRCULAÇÃO SISTÊMICA..	81
5.18. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM P1G10 .....	82
5.19. A PRESERVAÇÃO DO EFEITO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA .....	83
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma abordagem terapêutica utilizada em diferentes doenças de origem hematológica malignas e não malignas, tais como: leucemias agudas, leucemias crônicas, linfomas, mieloma múltiplo, anemias, imunodeficiências e doenças metabólicas hereditárias (PERINI, 2011; BAZINET; POPRADI, 2019; DUARTE et al., 2019; LACHANCE et al., 2021).

As células-tronco hematopoiéticas adultas são células indiferenciadas encontradas em tecido diferenciado, a medula óssea vermelha. Essas células são responsáveis pelo processo de hematopoiese que consiste na produção ininterrupta de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. É exatamente a produção dessas células que configura a manutenção do sistema circulatório e imunológico, permitindo que o corpo tenha o fornecimento adequado de oxigênio, defesa contra infecções e coagulação sanguínea (SUGIMURA et al., 2017). Desta forma, TCTH é um recurso terapêutico com o objetivo de restaurar a capacidade do organismo receptor de produzir células sanguíneas saudáveis, ao substituir a medula óssea danificada por células-tronco saudáveis do doador (EITELVEN, 2017; ELHAGE et al., 2022).

O TCTH utiliza três fontes principais de células progenitoras: medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical, cada uma com vantagens e desafios específicos (CHEUK, 2013). A coleta da medula óssea é realizada por aspiração de ossos como a crista ilíaca ou fêmur, em procedimento cirúrgico (BAZINET; POPRADI, 2019). O sangue periférico exige a mobilização prévia de células com fator estimulante de colônias (G-CSF), seguidas de leucoaférese para isolamento e criopreservação (MURARO et al., 2017). O sangue de cordão umbilical é coletado ao nascimento e estocado em bancos especializados, oferecendo praticidade, porém com menor volume celular. A escolha da fonte impacta diretamente a reconstituição hematopoética pós-transplante, sendo crucial na estratégia terapêutica (CIGOLINI, 2011; HOLTICK, 2014).

Além da origem das células, o TCTH classifica-se quanto ao tipo de doador em três modalidades: autólogo, singênico e alogênico. No transplante autólogo, realiza-se a coleta das células-tronco hematopoéticas do próprio paciente, que são tratadas e posteriormente reinfundidas. No transplante singênico, realizado entre gêmeos idênticos (monozigóticos), as células são obtidas do gêmeo saudável e transplantadas no receptor após o regime de condicionamento. Por fim, no transplante alogênico utilizam-se células de um doador compatível, aparentado ou não. Entre as modalidades de TCTH, o transplante alogênico consolida-se como o mais realizado na prática clínica devido à sua eficácia em condições

hematológicas complexas gerado pelo fenómeno do enxerto contra leucemia (ECL) (THOMAS, 1975; GYURKOCZA, 2010; GRAMEGNA et al., 2022).

Os fundamentos do TCTH alogênico remontam a 1950, quando E. Donnall Thomas estabeleceu o primeiro modelo experimental, demonstrando que a infusão de células da medula óssea e do baço eram capaz de proteger camundongos dos efeitos letais da irradiação corporal total (LORENZ, 1951; BARON; STORB, 2004). Porém, primeiro marco decisivo do TCTH em humanos só ocorreu em 1968, quando duas crianças – uma com imunodeficiência ligada ao cromossomo X e outra com síndrome de Wiskott-Aldrich – foram tratadas com sucesso. Esses casos pioneiros abriram caminho para novas aplicações, como o tratamento de anemia aplástica e, posteriormente, leucemias. O avanço foi impulsionado por dois fatores críticos: o desenvolvimento de técnicas avançadas de tipagem Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e a estruturação de registros globais de doadores que transformaram o cenário transplantológico, permitindo que pacientes sem doadores familiares pudessem se beneficiar da terapia (THOMAS, 2005).

O Brasil ostenta o terceiro maior registro de doadores de medula óssea do mundo, com 5,7 milhões de voluntários cadastrados no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME). No ano de 2023, o Redome viabilizou 369 transplantes com doador não-aparentado (alogênico) e enviou 100 amostras de doadores brasileiros para o exterior. Dados atuais do Ministério da Saúde, contabilizam 1.512 medulas ósseas doadas nos primeiros seis meses de 2024. Em paralelo, os Estados Unidos da América, lideram a classificação de doadores de medula óssea com mais de 10 milhões de pessoas cadastrados no Be The Match e, no ano de 2023 foram realizados 23.000 transplantes de medula óssea, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (ONU).

Entretanto, apesar da reconhecida eficácia do TCTH alogênico no tratamento de doenças hematológicas, este procedimento carrega um risco imunológico significativo: o desenvolvimento da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) ou *GVHD*, do inglês *Graft-versus-Host Disease*. Esta complicação grave, caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica desencadeada pela resposta imune das células do doador contra os tecidos do receptor, afeta entre 40% e 60% dos pacientes transplantados, representando um dos maiores desafios no campo da transplantologia hematopoética (BLAZAR, 2017; RESHEF, 2021; SOCIE & MICHONNEAU, 2022).

## 1.2 DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO (DECH)

A DECH emerge como a complicação mais frequente após o TCTH alogênico. Embora seja reconhecida como um obstáculo admissível, sua ocorrência permanece como um limitante crítico que compromete diretamente o sucesso terapêutico e a sobrevida dos pacientes (CHOE; FERRARA, 2021).

A primeira descrição da DECH surgiu em modelos animais em 1955, com o termo "doença secundária" (BARNES & LOUTIT, 1956; THOMAS, 1957). O cerne fisiopatológico da DECH é o reconhecimento imunológico das disparidades antigênicas entre doador e receptor, mediado por diferenças no HLA em humanos e pelo Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) em camundongos. Nesse processo, as células T do doador identificam os antígenos do receptor como "não-próprios", desencadeando a ativação de múltiplas vias inflamatórias e danos teciduais sistêmico. Todavia, a ocorrência e gravidade da DECH são influenciados por fatos que vão além da incompatibilidade entre HLA, abrangendo: intensidade do regime de condicionamento, características do enxerto (como fonte celular e grau de manipulação), variáveis do receptor e doador (idade, sexo) e até mesmo a profilaxia imunossupressora inapropriada (GALE, 1987; VRISENDORP, 2016; ALADAG, 2020).

Os critérios do *National Institutes of Health (NIH)* subdividem a DECH em quatro categorias principais: *I.* a DECH aguda clássica, que apresenta sinais característicos e ocorre dentro de 100 dias após o transplante; *II.* a DECH aguda persistente, recorrente ou tardia, que mantém as características da forma aguda, mas se manifesta após os 100 dias do transplante; *III.* a DECH crônica clássica, que pode surgir em qualquer momento após o transplante, é definida por suas características próprias e não apresenta traços clínicos da forma aguda e *IV.* a síndrome de sobreposição, que combina elementos tanto da DECH aguda quanto da crônica (FILIPOVICH et al., 2005; ZEISER; BLAZAR., 2017; SCHOEMANS, 2018).

A DECH do tipo aguda é a face de estudo desta pesquisa. A incidência da DECH aguda em pacientes que recebem o TACTH é de 20% a 70%, sendo considerada a principal causa de morte não relacionada a recidiva pela doença em tratamento (BAUMRIN et al., 2022).

### 1.2.1. Fisiopatologia da doença do enxerto-contrahospedeiro aguda

Há mais de meio século, Billingham postulou três requisitos fundamentais para o desenvolvimento da DECH: *I.* o enxerto deve conter células imunologicamente funcionais, ou seja, linfócitos T maduros; *II.* o organismo receptor deve apresentar imunossupressão suficiente para não rejeitar o transplante; *III.* o receptor deve expressar antígenos tissulares que não estão presentes no doador (MARTINEZ-CIBRIAN; ZEISER; PEREZ-SIMON, 2021).

Atendidos os três requisitos, o surgimento e a progressão da DECH são compreendidos como um processo composto por três etapas sequenciais, nas quais há interação entre os sistemas imunológicos inato e adaptativo:

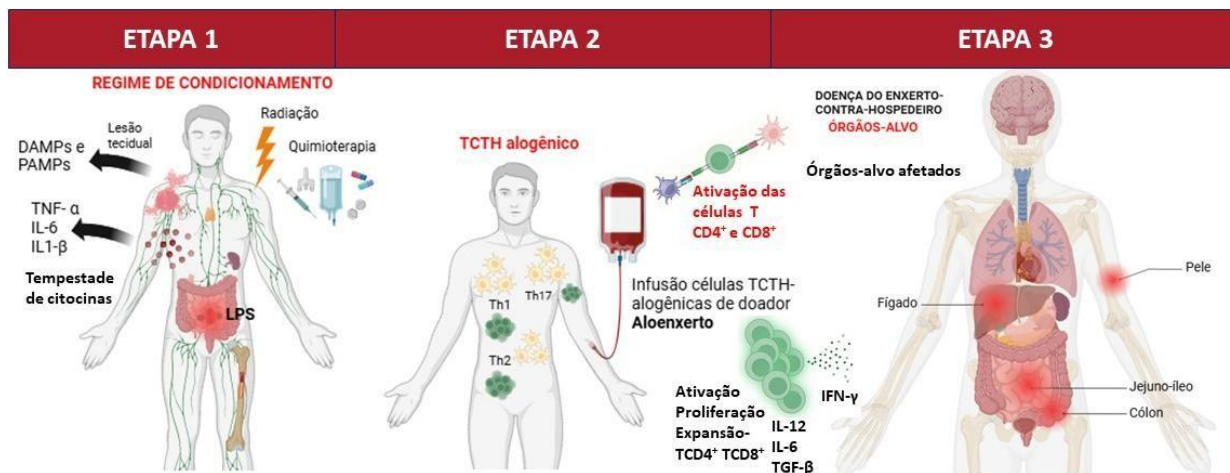
**Etapa 1– Efeitos do regime condicionamento:** o regime de condicionamento pré-transplante, que combina radioterapia e/ou quimioterapia é a etapa inicial no desenvolvimento da DECH. Seu objetivo é induzir imunossupressão para prevenir a rejeição do transplante e eliminar células tumorais residuais. No entanto, esse tratamento causa danos teciduais significativos em diversos órgãos, especialmente no trato gastrointestinal (TGI). Esses danos desencadeiam a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) (HENDEN; COLINA, 2015). Além disso, ocorre a liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), com destaque para o lipopolissacarídeo (LPS) (Fig. 1). Os DAMPs e PAMPs ativam os receptores do tipo Toll (TLR), os receptores contendo domínios de oligomerização de nucleotídeos (NOD-R). Esse processo é intensificado pelas células do sistema imunológico inato, que liberam espécies reativas de oxigênio (EROs) e metaloproteinases de matriz (MMPs). A ativação dos TLR e NOD-R também estimula a apresentação de antígenos, desencadeando a resposta imunológica adaptativa, um aspecto crucial da fase seguinte (BAUMRIN et al., 2022). Esses eventos iniciais geram uma cascata inflamatória, marcada pelo aumento na produção de citocinas, na expressão de moléculas de adesão e moléculas coestimulatórias, culminando na ativação de células dendríticas (CDs) e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) do hospedeiro. Esses mecanismos, conhecidos como "sinais de perigo", funcionam como o gatilho para o processo inflamatório subsequente (APOSTOLOVA; ZEISER, 2016; ZEISER et al., 2017).

**Etapa 2- Ativação das células T:** a DECH depende da interação, ativação, proliferação e diferenciação das células T do doador, as quais são estimuladas pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor. Esse processo corresponde à segunda etapa da patogênese (ZEISER; BLAZAR, 2017). Previamente ativadas pela liberação de citocinas inflamatórias, dano tecidual e estresse celular, as APCs do receptor migram para os linfonodos, onde ocorre a apresentação dos antígenos do hospedeiro às células T do enxerto. Essa apresentação é mediada pelo complexo de histocompatibilidade (HLA), no qual as APCs exibem peptídeos do receptor para as células T do doador. Nessa fase, também acontece a expansão clonal, em que as células T do doador proliferam e se diferenciam em subpopulações como Th1, Th2 e Th17, em resposta à estimulação pelas APCs (Fig. 1) (FUJIWARA et al., 2014). É justamente nesse estágio que ocorre o reconhecimento da disparidade antigênica entre os complexos de

histocompatibilidade, um evento crucial que desencadeia a interação e o recrutamento de células efetoras, tais como:

células T auxiliares ( $CD4^+$ ), células T citotóxicas ( $CD8^+$ ), células natural killers (NK). Essas células desempenham um papel central na amplificação da resposta imunológica e na mediação do processo inflamatório característico da DECH (POPLI et al., 2014; GHIMIRE et al., 2017; ZEISER; BLAZAR, 2017).

**Etapa 3- Efetora celular:** os linfócitos T ativados migram para os órgãos-alvo da DECH, como pele, trato gastrointestinal (TGI) e fígado (Fig. 1 e 2). O  $IFN-\gamma$ , liberado principalmente pelas células T  $CD4^+$ , estimula as APCs e induz a produção de quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5, que promovem o recrutamento de leucócitos para os tecidos afetados (WANG; YANG, 2015). A presença de aloantígenos de MHC-II do receptor nos órgãos-alvo favorece o agravamento dos danos teciduais, amplificando ainda mais a ativação da resposta imune adaptativa. Nessa fase, o desencadeamento da via apoptótica citotóxica por células T  $CD8^+$  com liberação granzimas e ativação subsequente de caspases culmina na morte celular programada (apoptose) (Fig. 1) (RAMACHANDRAN; KOLLI; STROWD, 2019).



**Figura 1. Representação das etapas que compreendem a fisiopatologia da DECH.** A primeira etapa envolve a ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs) do hospedeiro, desencadeada pelo dano tecidual causado pelo regime de condicionamento. Na segunda etapa, os linfócitos T do doador são ativados pelas APCs do hospedeiro, resultando em regularidade e diferenciação. Por fim, na terceira etapa, conhecida como etapa efetora inflamatória, os linfócitos T diferenciados migram para os órgãos-alvo, promovendo a morte tecidual por apoptose. Figura do autor criada com o Biorender – criada em: 12/01/24

### 1.3 A IMPORTÂNCIA DA REAÇÃO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA PARA A EFICIÊNCIA DO TCTH

A aplicabilidade recorrente da terapia com TCTH está diretamente ligada a um mecanismo imunológico conhecido como efeito enxerto-contra-leucemia (ECL) ou *GVL* (*Graft-versus-Leukemia*). O efeito exercido contra a leucemia envolve uma interação entre as células T do doador e as células leucêmicas do receptor. As células T do doador reconhecem estímulos específicos em células tumorais, incluindo proteínas e peptídeos exclusivos ou superexpressos nestas células. Além dos antígenos tumorais, as células T podem identificar antígenos dos hospedeiros alterados pela doença. Quando as células T do doador encontram essas células leucêmicas elas são ativadas e liberam citocinas que estimulam sua especialização e diferenciação em células efetoras. Assim, as células T efetoras CD8<sup>+</sup> destroem as células leucêmicas por citotoxicidade direta, liberando perforinas e granzimas que induzem a morte celular (ZHAO et al., 2014).

O efeito aplicado contra a leucemia é fundamental para eficácia terapêutica do transplante, pois contribui para a eliminação das células leucêmicas residuais que podem persistir no organismo do receptor, prevenindo a recidiva da doença. Diante disso, a identificação de terapias que reduzam a DECH sem prejudicar o efeito enxerto-contra-leucemia (ECL) torna-se uma prioridade científica e médica, demandando estratégias medicamentosas que equilibrem com precisão a resposta antitumoral e o controle da inflamação (ELHAGE et al., 2022; TESHIMA; HASHIMOTO, 2023).

### 1.4 DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA NO INTESTINO

Os regimes de condicionamento, antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e a introdução de linfócitos do doador alteram profundamente a composição da microbiota intestinal (TAUR et al., 2014; SHONO et al., 2015; REFEI; JENQ, 2020). A desregulação imunológica resultante na DECH aguda causa danos adicionais ao epitélio intestinal, afetando especialmente células-tronco, células de Paneth e células caliciformes. O intestino é o órgão mais visivelmente afetado e o seu comprometimento está fortemente associado à mortalidade, principalmente a não relacionada à recidiva da doença em tratamento (LLORENTE et al., 2014). Além disso, desequilíbrios na microbiota intestinal desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da DECH aguda no intestino (REFEI; JENQ, 2020)

Na DECH aguda, a desregulação imunológica compromete a barreira da mucosa intestinal, resultando em diarreia secretora grave. A destruição imunomediada da mucosa, especialmente no íleo, prejudica a reabsorção de fluidos, contribuindo para a característica de

diarreia volumosa. O comprometimento das junções estreitas ou zonas ocludentes, aliado à intensa resposta inflamatória, provoca perda de proteínas da mucosa e aumento da pressão osmótica, que atraem líquidos para o lúmen intestinal (ZEISER; SOCIEDADE; BLASAR, 2016). Por conseguinte, os danos à barreira intestinal favorecem a translocação bacteriana, permitindo que microrganismos e produtos derivados deles, como o LPS, atravessem o epitélio para o sistema circulatório e linfático, situação que exacerba a resposta inflamatória sistêmica, agravando o quadro clínico da DECH aguda (LANGREHR et al., 2000; TU et al, 2016; ZEISER; BLAZAR, 2017).

O diagnóstico intestinal é realizado através de exames variados como: marcadores sorológicos, radiologia, endoscopia, colonoscopia. Achados histológicos mostram degeneração das células da cripta, apoptose de células epiteliais, dilatação cística das glândulas das criptas no intestino. Embora essas ferramentas sejam úteis para confirmar o diagnóstico ou identificar patologias alternativas ou coexistentes, o diagnóstico de DECH aguda é, em última instância, baseado nas características clínicas típicas e na exclusão de outras doenças (DIGNAN et al., 2012; REZENDE et al., 2013).

#### 1.4.1. Doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda no fígado

O fígado é conhecido de maneira sucinta como o órgão metabolizador do corpo humano, possuindo funções diversas e importantes a fisiologia humana. O fígado é a maior glândula presente no corpo e possui uma relação estreita com o intestino, produzindo a bile, que auxilia no processo digestório emulsificando gorduras, além de regular os níveis de glicose, lipídeos e proteínas no sangue (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

Do ponto de vista imunológico, o fígado é responsável pela produção de proteínas de fase aguda que auxiliam na ativação do sistema imune. Em relação a microbiota intestinal, o fígado, atua na modulação da resposta imune, filtrando substâncias e microrganismos provenientes do TGI por meio da circulação porta, protegendo o organismo de possíveis infecções e inflamações. Na DECH, o fígado, e o intestino, como descrito acima, podem sofrer danos simultâneos devido à resposta inflamatória exacerbada (GOLA et al., 2021; ZEISER; TESHIMA, 2021).

O diagnóstico de acometimento hepático por DECH é descrito por alterações nos níveis séricos de bilirrubina (conjugada/direta), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina em níveis semelhantes aos observados em icterícia colestática (HARRIS et al., 2015). Os achados histopatológicos de pacientes com a doenças mostram destruição dos ductos biliares, com perda da arquitetura normal e presença de células

gigantes multinucleadas. A lesão dos ductos biliares leva a colestase, que pode ser evidenciada por elevação das enzimas hepáticas citadas. Outro achado comum é a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear proeminente, composto principalmente por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, que pode ser visto tanto nos espaços portais quanto nos lóbulos hepáticos, o que causa destruição da interface limitante entre os hepatócitos. A evolução da doença em nível hepático pode evoluir para deposição de colágeno nos espaços portais e periportais, característica da mudança tecidual conhecida como fibrose (THOOLEN et al., 2010; HASEGAWA et al., 2024).

### 1.5 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA A DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO

A abordagem terapêutica da DECH inclui estratégias que não apenas visam o alívio sintomático, mas também buscam modificar o curso da doença e minimizar as complicações decorrentes do processo inflamatório. No contexto da profilaxia da DECH aguda, a Ciclosporina é amplamente utilizada como um imunossupressor, atuando por meio da inibição da calcineurina, o que bloqueia a ativação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2. Esse mecanismo resulta na supressão da resposta imunológica exacerbada, prevenindo o dano tecidual característico da doença (TAFAZOLI, 2015). Não obstante, a terapia padrão-ouro para o tratamento da DECH aguda e crônica é uso de corticosteroides, principalmente glicocorticoides, cuja escolha e dosagem são determinadas pela gravidade do quadro clínico. Esses agentes imunossupressores são fundamentais no controle da resposta inflamatória desregulada, sendo amplamente empregados na prática clínica para minimizar as complicações associadas à DECH (ZEISER E BLAZAR, 2017).

O glicocorticoide de maior utilização é a Metilprednisolona, enquanto, em casos mais graves, opta-se pela Dexametasona devido à sua maior potência e duração de ação (RUUTU et al., 2013). O mecanismo de ação dos glicocorticoides no manejo da DECH fundamenta-se na supressão do sistema imunológico, por meio da redução da liberação de enzimas lisossômicas, inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, diminuição da atividade dos linfócitos B e T, além de bloquearem a produção de citocinas pró-inflamatórias (CAIN E CIDLOWSKI, 2017). Entretanto, o manejo clínico da DECH não se limita ao uso de glicocorticoides, a prescrição de agentes antimicrobianos, incluindo antibacterianos, antivirais e antifúngicos é frequentemente necessária, com o objetivo de prevenir infecções oportunistas que representam um risco significativo nesses pacientes imunossuprimidos (STANGHELLINI et al., 2017).

Contudo, uma proporção significativa de pacientes submetidos ao tratamento de primeira linha não responde à terapia convencional, sendo aproximadamente 40% descritos como refratários aos corticoides. Para esses casos, recorre-se à terapia de segunda linha, embora não exista um consenso médico definitivo quanto à sua utilização (ZEISER et al., 2023). Entre as opções terapêuticas de segunda linha, destaca-se o Tracrolimus, um inibidor da ativação de linfócitos T, que atua por meio da inibição da calcineurina e a Ciclosporina que pode ser reposicionada em casos de resistência a corticosteroides (DIGNAN et al., 2012; TAFAZOLI, 2015). Outra alternativa é o Sirolimus, também conhecido como Rapamicina, que apresenta ação imunossupressora ao inibir a via de sinalização da proteína mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), essencial para a proliferação celular e a produção de anticorpos (CHEN et al., 2021).

Nos últimos anos, diante do aumento significativo de pacientes refratários ao tratamento padrão-ouro, houve uma expansão notável nos estudos e na busca por novas terapias farmacológicas. Esse esforço resultou no desenvolvimento de opções terapêuticas mais recentes, como o Ruxolitinibe, um inibidor seletivo das Janus Kinases (JAK1 e JAK2), que desempenham um papel essencial na mediação da sinalização de diversas citocinas e fatores de crescimento (GOUVEIA et al., 2021). Outro agente promissor é o Ibrutinib, que inibe a proliferação de células B por meio da inibição irreversível da tirosina quinase de Bruton (BTK), essencial para a sinalização das células B. Além disso, o Belumosudil surge como uma opção inovadora, atuando como um inibidor da atividade da serina/treonina quinase ROCK2. Essa inibição regula vias de sinalização mediadas por ROCK2, que desempenham papéis críticos na modulação das respostas imunológicas pró e anti-inflamatórias (VADAKKEL et al., 2024).

Embora os avanços recentes na terapia de segunda linha representem um progresso no manejo de pacientes refratários à DECH, a eficácia limitada, os efeitos adversos significativos, entre eles fadiga, náuseas, diarreia e dor abdominal, e os custos elevados desses tratamentos, ainda constituem desafios consideráveis. Nesse cenário, busca-se por alternativas terapêuticas. Em particular, este estudo propõe a investigação da fração proteolítica P1G10, extraída do latex de mamão imaturo da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*, como uma alternativa terapêutica para a DECH. Estudos pré-clínicos sugerem que a P1G10 possui propriedades imunomoduladoras relevantes, capazes de produzir efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

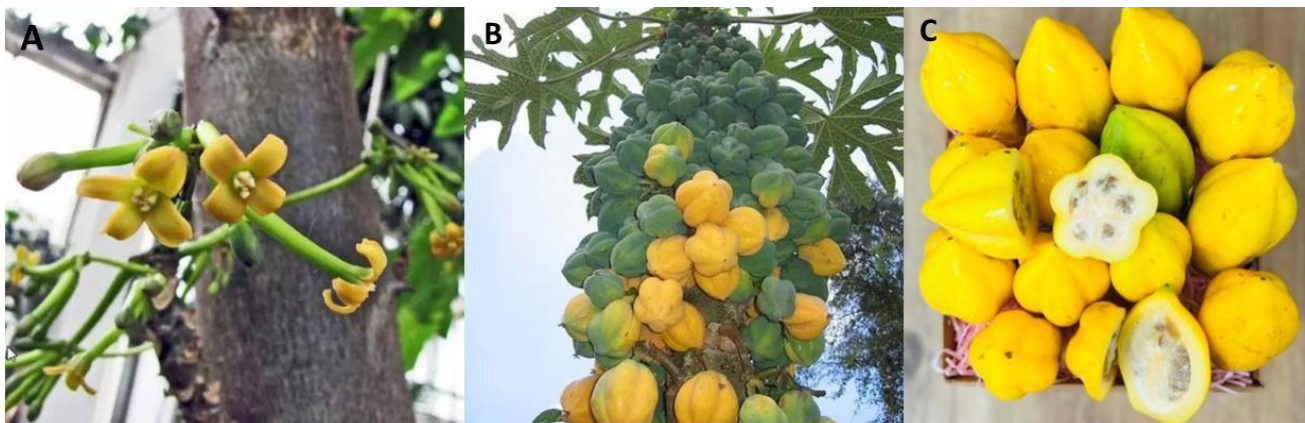
## 1.6 A ESPÉCIE *VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS*

O *Vasconcellea cundinamarcensis*, popularmente conhecido como mamoeiro-da-montanha, é uma espécie pertencente à família Caricaceae, com distribuição nativa nas regiões ocidentais da América do Sul. Sua ocorrência abrange países como Colômbia, Equador, Peru, Argentina, Bolívia e Chile, onde se desenvolve predominantemente em altitudes entre 1.500 e 3.000 metros acima do nível do mar (KYNDT et al., 2005). Trata-se de uma planta arborescente que pode alcançar alturas de 3 a 10 metros, caracterizada por um caule suculento, meduloso e geralmente não ramificado, com textura lisa e coloração esverdeada. Suas folhas são grandes, palmatilobadas, com lóbulos profundos, dispostas de forma alternada ao longo do caule (VIDIGAL, 2009).

A espécie apresenta sexualidade trioica, produzindo três tipos de flores: femininas, masculinas e hermafroditas (Fig 2. A). As flores femininas e hermafroditas desempenham papel fundamental na produção dos frutos, que possuem formato oblongado ou elipsoidal, medindo entre 7 e 10 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura (KIGER, 1988; BADILLO, 2000).

Quando maduros, os frutos apresentam coloração amarela, polpa suculenta e contêm numerosas sementes escuras, envoltas por uma substância gelatinosa (Fig 2. C). O sabor insípido ou amargo dos frutos crus, que inviabiliza seu consumo *in natura*, resulta principalmente da alta concentração de enzimas proteolíticas. Essas enzimas degradam proteínas essenciais durante a mastigação, comprometendo a percepção do paladar e gerando características organolépticas desfavoráveis. No entanto, o cozimento é amplamente utilizado para reduzir o amargor e tornar o fruto mais palatável, garantindo maior segurança alimentar. Esse processo também neutraliza compostos que podem causar desconforto digestivo, como as próprias enzimas proteolíticas ou produtos secundários das reações enzimáticas, como os tiois. Em algumas culturas, os frutos cozidos são utilizados na elaboração de compotas, geleias e sobremesas, aproveitando seu valor nutricional e suas propriedades benéficas. Além disso, o processamento térmico não apenas melhora o sabor, mas também pode aumentar a biodisponibilidade de determinados nutrientes presentes no fruto como proteínas, antioxidantes (polifenóis e caratenoides) e minerais como o magnésio (BUZETA; EYHERALDE, 1982).

Todavia, o aspecto relevante da espécie para esse estudo é o látex extraído do fruto, que apresenta características físico-químicas interessantes como a alta concentração de cisteíno proteases.



**Figura 2.** (A) Inflorescências (B) Frutos maduros e imaturos (C) Frutos maduros; evidenciando características da polpa. Fonte: tropicalfruitbox.com e thjardins.com.br – acesso em: 15/01/2025

### 1.6.1 Fração proteolítica P1G10 rica em cisteíno proteases

O látex do fruto da *Vasconcellea cundinamarcensis*, extraído de frutos em sua fase imatura, apresenta um aspecto leitoso e viscoso, sendo composto por uma variedade de substâncias, incluindo carboidratos, vitaminas, sais minerais, peptídeos, de baixo peso molecular, além de cisteína proteases, enzimas responsáveis por sua alta atividade proteolítica (LOGUERCIO; BRAVO; SALAS, 1990; BRAVO; HERMOSILLA; SALAS, 1994). O processo de obtenção da fração P1G10 envolve técnicas de separação cromatográfica por exclusão molecular em coluna Sephadex-G10, seguidas de ultrafiltração, permitindo a purificação e concentração de seus compostos ativos, como descrito por Silva et al, (2003). A separação cromatográfica permite a obtenção de dois picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno proteases (APÊNDICE 1).

A fração P1G10 destaca-se por sua riqueza em cisteíno proteases, apresentando a maior atividade proteolítica já observada entre as enzimas de outras espécies de mamíferos, incluindo *Carica papaya*. Além disso, diferem em propriedades como pH ótimo, ponto isoeletrico e reatividade imunológica (GRAVINA, TERMIGNONI, SALAS, 1994; BRAVO, HERMOSILLA, SALAS, 1994), sendo que algumas dessas enzimas estão ausentes no látex de *Carica papaya*. Essas características conferem à fração P1G10 um significativo potencial biotecnológico e terapêutico (BAEZA; CORREA; SALAS et al., 1990; TEIXEIRA et al., 2008)

### 1.6.2. Características farmacocinéticas e aspectos toxicológicos da P1G10

A fração teve a farmacocinética avaliada com sua marcação por  $^{99m}\text{Tc}$  (Tecnécio) em camundongos Swiss, apresentando perfil farmacocinético caracterizado por uma distribuição rápida ( $V_d = 2,32 \pm 1,03/\text{hora}$ ) e mínima em tecidos lipofílicos, como cérebro e tecido adiposo,

o que corrobora sua baixa permeabilidade por barreiras biológicas seletivas a macromoléculas. Em relação a excreção ( $k_{el} = 0,22 \pm 0,20/\text{hora}$ ), foi confirmada pela alta captação inicial em órgãos envolvidos nesses processos, como fígado, rins e bexiga, sendo compatível com a natureza hidrofílica da fração (LEMOS et al, 2016)

A biodisponibilidade de P1G10 por via oral é inferior a 10%, sugerindo sua manutenção no trato gastrointestinal. O aumento da radioatividade no estômago e intestino grosso após a administração oral reforça sua interação com o trato digestivo (LEMOS et al., 2016), corroborando estudos anteriores que mostram seu efeito gastroprotetor (ARAUJO & SILVA et al., 2014). Em contrapartida, pelas vias intravenosa e subcutânea, P1G10 apresenta biodisponibilidade semelhante, seguindo um modelo farmacocinético de dois compartimentos, caracterizado por rápida biodistribuição após a administração (LEMOS et al., 2016).

Ensaio de toxicidade genômica, incluindo o teste de Ames e análises de micronúcleos, não identificaram potencial mutagênico ou genotóxico para o P1G10 nas concentrações avaliadas. A classificação toxicológica foi apresentada como prejudicial (categoria 4), com efeitos adversos restritos a sinais de flebite e lesões localizadas decorrentes da administração parenteral, provavelmente associadas à atividade proteolítica da fração. No entanto, não foram encontradas alterações significativas na pele, olhos, membranas mucosas ou nos sistemas de defesa, circulatório e nervoso central (LEMOS et al., 2016).

### 1.6.3. Ação da fração proteolítica P1G10 em diferentes modelos experimentais: perspectivas na modulação inflamatória

A fração proteolítica P1G10 vem sendo estudada há mais de duas décadas quanto ao seu potencial efeito farmacológico em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Dentre os modelos experimentais utilizados para a investigação dos efeitos da P1G10, destacam-se os modelos murinos, que permitem a avaliação de sua ação em contextos fisiológicos e patológicos mais complexos. Estudos com aplicação tópica em camundongos mostraram o efeito cicatrizante da P1G10 em diferentes modelos de lesão tecidual cutânea. Em modelos experimentais de queimaduras térmicas, a fração P1G10 mostrou dupla ação terapêutica: além de estimular a cicatrização tissular, acelerou significativamente o processo de epitelização (GOMES et al., 2010). Esse efeito regenerativo, também, foi observado em lesões induzidas por radiação ultravioleta (UVB), onde a P1G10 promoveu a reparação tecidual (FREITAS et al., 2017; FREITAS et al., 2019). Estudos mais recentes revelaram que, no mesmo modelo de dano por UVB, a P1G10 exerce efeito antioxidante e anti-inflamatório, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), elevando os níveis das enzimas glutatona peroxidase e catalase, e

suprimindo a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (FREITAS et al., 2025). Além dos modelos experimentais, um estudo clínico prospectivo randomizado avaliou a eficácia e segurança da P1G10 no tratamento de úlceras crônicas em pacientes com Diabetes mellitus tipo 2, mostrando seu potencial terapêutico em condições clínicas (TONACO et al., 2018).

Com ênfase nos aspectos anti-inflamatórios, estudos avaliaram o efeito modulador da fração proteolítica P1G10 em modelos inflamatórios, evidenciando sua capacidade em atenuar processos inflamatórios exacerbados. Em modelo de colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS), P1G10 administrado por via oral, mostra uma significativa redução do perfil inflamatório e do dano tecidual nos animais tratados. Essa ação foi acompanhada por uma diminuição na atividade da mieloperoxidase (MPO) e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), bem como por um aumento nos níveis da interleucina-10 (IL-10), uma citocina conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias (ALBUQUERQUE et al., 2020). Em outro modelo experimental, o tratamento oral com a P1G10 evidenciou sua atividade protetora contra úlceras gástricas, além de efeitos cicatrizantes sobre as lesões. Ainda, foram identificadas possíveis ações relacionadas à modulação de sistemas antioxidantes, contribuindo para a proteção tecidual (SILVA et al., 2015).

De maneira notável, efeitos antimetastáticos e antitumorais foram observados em modelos de melanoma murino submetidos à administração subcutânea do P1G10, destacando seu potencial terapêutico em neoplasias malignas (DITZ et al., 2015). Em modelo de carcinoma de mama triplo negativo, P1G10 e uma das subfrações CMS2 são moduladores inflamatórios e parecem atuar sobre macrófagos, os mantendo com perfil M1, que atacam as células tumorais (Dissertação e Tese de Ariadne Braga, dados não publicados).

Os achados experimentais destacam o amplo espectro de atividades biológicas da fração proteolítica P1G10, evidenciando seu potencial como agente terapêutico em processos de reparo tecidual, condições inflamatórias, doenças neoplásicas e outras patologias. Esses resultados reforçam a relevância de seu uso em diferentes contextos clínicos e motivam novas investigações a cerca de suas propriedades bioativas.

Em particular, a ação imunomoduladora, anti-inflamatória e antitumoral da P1G10 desperta grande interesse no contexto de doenças sistêmicas, como a DECH. Sua capacidade de regular a resposta inflamatória associada à DECH torna-se um ponto de investigação promissor, evidenciando a necessidade de estudos que elucidem seus mecanismos específicos de atuação e seu potencial terapêutico nesta condição. Dessa forma, a hipótese deste estudo é que a fração proteolítica P1G10 seja capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios e

imunomoduladores na doença do enxerto-contra-hospedeiro, contribuindo para melhor evolução clínica e sobrevida dos camundongos.

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) é uma complicação grave e potencialmente fatal que ocorre como consequência do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas. Trata-se de uma doença sistêmica de rápida progressão, caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada que resulta em lesões graves, disfunção e morte tecidual em órgãos essenciais à sobrevivência, como pele, mucosas, pulmões, fígado e o trato gastrointestinal (FERRARA et al., 2017). De acordo com dados recentes, a incidência da DECH pode atingir até 70% dos pacientes submetidos a esse tipo de transplante, tornando-a um desafio. Atualmente, a terapia padrão para o DECH consiste no uso de corticosteroides, amplamente reconhecida como a abordagem de primeira linha para o controle da inflamação e da resposta imunológica exacerbada. No entanto, aproximadamente 40% dos pacientes acometidos não respondem ao tratamento padrão, sendo classificados como refratários à corticoterapia (ZHEISER et al., 2023). Esse grupo apresenta um prognóstico mais desfavorável, uma vez que não existe um consenso clínico sobre a melhor estratégia terapêutica para esses casos. Para esses pacientes, recorre-se a alternativas de segunda linha, que incluem medicamentos imunossupressores como o Tacrolimus. Contudo, essas abordagens apresentam limitações, tanto em termos de eficácia quanto de segurança, frequentemente associadas a efeitos adversos graves. Nesse contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas torna-se imprescindível. Esse estudo propõe investigar uma abordagem inovadora para o tratamento de segunda linha da DECH, utilizando uma fração de cisteíno proteases extraída do fruto imaturo do mamão *Vasconcellea cundinamarcensis*, conhecida por sua eficiente modulação e inibição de vias inflamatórias em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da fração proteolítica de cisteíno proteases (P1G10), extraída do látex de mamão imaturo da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*, no tratamento da DECH aguda murina em animais C57BL/6.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir a dose efetiva de P1G10, para os experimentos subsequentes, em curva dose resposta (0,3, 3,0 e 30,0 mg/kg), sobre a evolução da DECH e sobrevida dos animais.

Em animais com DECH induzida submetidos o tratamento com PG10, avaliar:

2. O enxertamento dos órgãos linfóides.

3. A resposta inflamatória associada à DECH;

3.1. O recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo da doença (intestino) utilizando microscopia intravital;

3.2. O acúmulo de células inflamatórias em órgãos-alvo (intestino e fígado) por Citometria de Fluxo;

3.3. Os níveis de citocinas e quimiocinas por ELISA

4. A evolução dos aspectos histopatológicos dos órgãos-alvo da DECH murina;

5. A quantificação das células caliciformes intestinais;

6. A translocação de bactérias por meio do crescimento de microrganismos no lavado peritoneal, fígado e sangue;

6.1. A permeabilidade intestinal de camundongos com DECH usando azul de Evans;

7. O efeito do enxerto-versus-leucemia (GVL).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos, isogênicos, com idades entre oito a doze semanas, pertencentes às linhagens C57BL/6, C57BL/6-GFP+ e Balb/c, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados em estufas ventiladas (Alesco® ES2), em ambiente climatizado, com temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de luz e escuridão (7h-19h). Todos os animais tiveram acesso irrestrito a água e ração (*ad libitum*). Todos os procedimentos experimentais conduzidos ao longo deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) número 93/2023.

### 4.2. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO P1G10

A fração proteolítica P1G10 foi fornecida pelo Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. O látex foi coletado a partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcensis* e armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o material foi liofilizado e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. Para a separação cromatográfica, 15,0 g do látex liofilizado foram dissolvidos em 75,0 mL de tampão de ativação (Apêndice A), sob agitação por 30 minutos, seguida de centrifugação ( $9.000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi filtrado em gaze dupla, e o resíduo foi reextraído com 25,0 mL do mesmo tampão, repetindo-se o processo de centrifugação e filtração. O filtrado combinado foi aplicado em uma coluna de gel-filtração (Sephadex® G-10), previamente equilibrada por 48 h com tampão de acetato de sódio 1,0 M. As frações foram eluídas com fluxo constante de 0,25 mL/min, coletadas em alíquotas de 5 mL e monitoradas por absorbância a 280 nm. Dois picos cromatográficos distintos foram obtidos, sendo as frações do primeiro pico reunidas para compor a fração P1G10 e do segundo para compor a fração P2G10. Para purificação adicional, a fração P1G10 foi submetida à ultrafiltração em membrana com corte molecular de 10 kDa, lavada três vezes com água deionizada e recolhendo a solução residual que posteriormente foi liofilizada (Fig. 3). Para caracterização, a fração P1G10 foi submetida à determinação da concentração protéica e da atividade amidásica, utilizando o substrato BAPNA (GOMES et al., 2008).



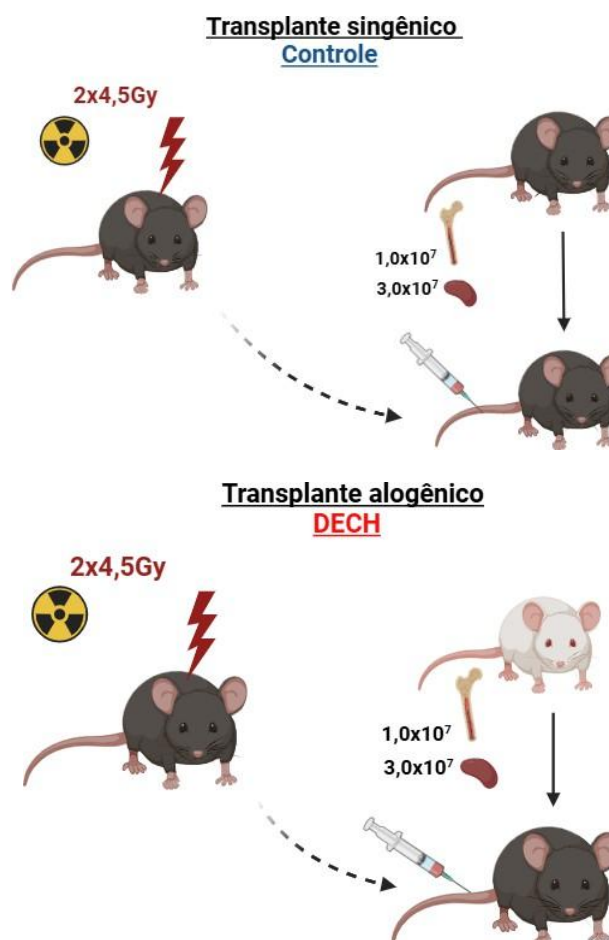
**Figura 3. Fração proteolítica liofilizada.** A fração proteolítica (PIG10) liofilizada após separação cromatográfica em Sephadex-G10 que é posteriormente diluída e utilizada para os tratamentos experimentais. Figura do autor- criada em: 16/01/25.

#### 4.3. INDUÇÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO

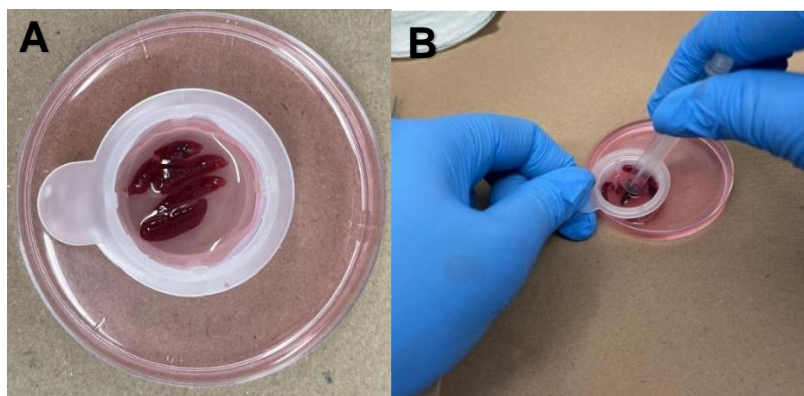
Os camundongos receptores, C57Bl/6, sofreram ablação total da medula com duas doses de 4,5Gy de radiação gama realizadas no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN). Posteriormente a segunda dose de irradiação, os animais receberam  $3 \times 10^7$  esplenócitos e  $1 \times 10^7$  células da medula por injeção intravenosa na cauda. O grupo controle recebeu as células de C57BL/6, ou seja, transplante singênico, não desenvolvendo a doença; o grupo DECH recebeu células de Balb/c, transplante alogênico, desenvolvendo, assim, a doença (Fig. 4).

As células de esplenócitos foram obtidas de um pool do baço dos animais doadores, que foram retirados, macerados e filtrados em filtro *Cell Strainer Falcon® de nylon (70µm)* e mantidos em RPMI-1640 Cultilab® gelado (Fig. 5). As células da medula foram retiradas do fêmur dos camundongos com o auxílio de seringas e também alocadas em meio RPMI-1640 Cultilab® gelado (Fig. 6). Os dois tipos de células foram submetidos a centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos. Após o processo, o sobrenadante foi descartado, e o pellet resultante foi ressuscitado em 10 mL de meio RPMI-1640 (Fig. 7). Deste volume, foram retirados 10 µL, que foram diluídos em 900 µL de RPMI-1640. A partir dessa solução, 50 µL foram combinados com 50 µL de azul de Tripán, garantindo uma homogeneização. Posteriormente, as células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer. Esta etapa de restrição foi orientada com o objetivo de verificar as previsões celulares e ajustar a quantidade de células viáveis para serem enxertadas nos camundongos (BERG et al., 2021).

Para mitigar a toxicidade decorrente do modelo de irradiação corporal total, os camundongos foram tratados, por um período de 15 dias, com uma solução oral de ciprofloxacino (70 mg/L), adicionada à água.

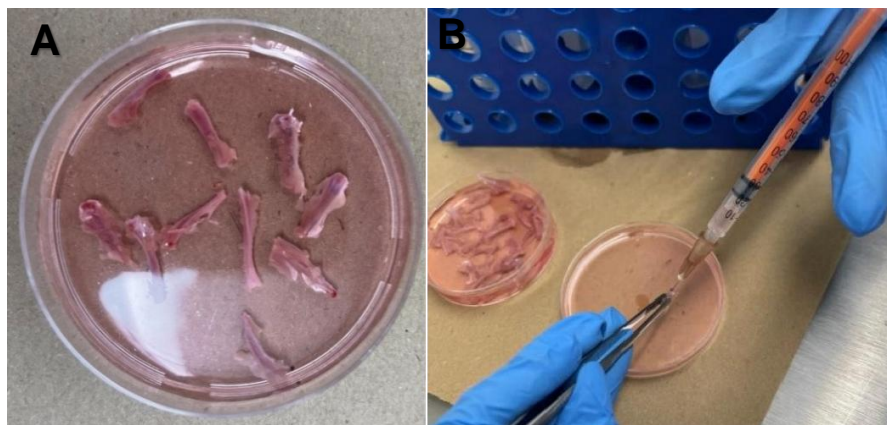


**Figura 4. Indução da doença do enxerto-contra-hospedeiro.** Duas doses de radiação gama de 4,5 Gy foram aplicadas previamente ao transplante, que consistiu da injeção de um pool de células composto por  $1 \times 10^7$  células da medula óssea e  $3 \times 10^7$  de esplênocitos de animais C57BL/6J em C57BL/6J para o grupo controle (transplante singênico), enquanto o grupo DECH recebe o pool contendo células de Balb/c (transplante alogênico). Figura do autor criada com Biorender – criada em: 06/12/24.

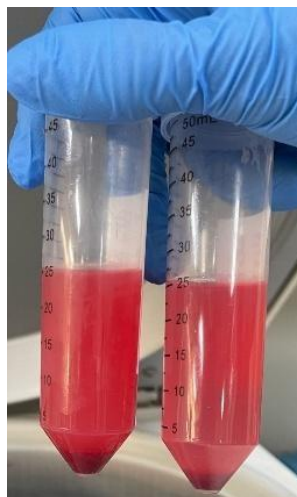


**Figura 5. Obtenção das células do baço.** (A) Baço retirado (B) Processamento de maceração para obtenção de células do baço. Procedimento de obtenção de esplênocitos: os camundongos são anestesiados e submetidos à

eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, é realizada uma incisão longitudinal para a remoção do baço, que é macerado em um *CellStrainer* com meio de cultura RPMI para preservação e obtenção das células. Figura do autor- criada em: 20/01/25.



**Figura 6. Obtenção das células da medula.** (A) Medula retirada (B) Processamento para obtenção as células da medula. Procedimento de obtenção de células da medula óssea: os camundongos são anestesiados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, o fêmur é removido, e suas células são extraídas com o auxílio de uma agulha, sendo posteriormente armazenadas em meio de cultura RPMI para preservação. Figura do autor- criada em: 20/01/25.



**Figura 7. Processamento das células do baço e medula.** Centrifugação das células do baço (esquerda) e medula (direita) para posterior contagem das células viáveis e infusão caudal nos animais para o transplante.

#### 4.4. ESCOLHA DAS DOSES TESTADAS DE P1G10

As doses de 0,3, 3,0 e 30,0 mg/kg da fração proteolítica P1G10 foram selecionadas com base no estudo de Albuquerque et al. (2020), intitulado "*The Proteolytic Fraction From *Vasconcellea cundinamarcensis* Latex Displays Anti-Inflammatory Effect in A Mouse Model of Acute TNBS-Induced Colitis*". Nesse trabalho, os autores demonstraram que essas concentrações apresentam efeitos anti-inflamatórios significativos em um modelo de colite aguda induzida por TNBS, sugerindo uma possível relação dose-resposta biologicamente relevante. No presente estudo, a avaliação da melhor dose foi realizada por meio da análise dos

parâmetros clínicos em animais com DECH, tratados com a fração de cisteíno proteases (P1G10). Como controles, foram utilizados: I. Grupo submetido ao transplante de células-tronco hematopoéticas singênicas, que não desenvolve DECH; II. Grupo veículo, que desenvolve DECH e recebe apenas fosfato tamponado salino (PBS). A seleção dessas doses permitiu investigar não apenas a eficácia da P1G10 na modulação da DECH, mas também estabelecer uma comparação direta com os achados prévios em modelos inflamatórios distintos, garantindo uma abordagem translacional consistente. Além disso, a variação entre doses baixas, intermediárias e altas possibilitou identificar possíveis efeitos dose-dependentes, contribuindo para uma análise mais robusta do potencial terapêutico da fração proteolítica no contexto da DECH.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS

A avaliação do desenvolvimento da DECH é realizada por meio do monitoramento de sinais clínicos apresentados pelos animais experimentais. Os parâmetros analisados incluem variação de peso, postura, textura do pelo, integridade da pele, nível de atividade, características das fezes e presença ou ausência de sangue nas fezes (Tabela 1) A classificação atribuída varia de 0 a 14, sendo determinada de forma individual para cada camundongo. A aplicação da escala de avaliação ocorre a cada dois dias após o transplante de células-tronco hematopoéticas, permanecendo em vigor ao longo de todo o período experimental (CASTOR et al. 2010, 2011). Essa metodologia possibilita uma análise contínua e detalhada da progressão clínica do DECH, permitindo correlacionar os sinais clínicos com a gravidade da doença ao longo do experimento. Desta forma, é possível obter dados confiáveis e padronizados, que são orientados para a avaliação dos efeitos de intervenções terapêuticas e para a compreensão dos mecanismos subjacentes à patogênese da DECH.

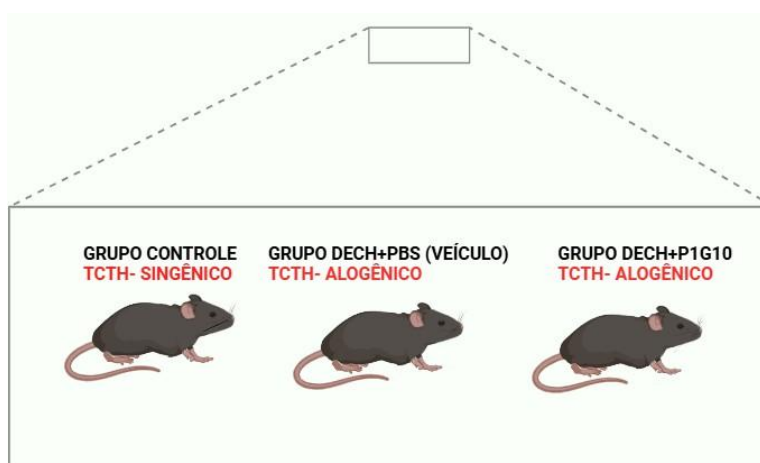
**Tabela 1: Avaliação dos parâmetros clínicos**

<b>Critérios avaliados</b>	<b>Pontuação clínica</b>
Peso	0= normal, 1=10%, 1,5=10%-20%, 2=<20%
Postura	0= normal, 1= inclinação leve, 2= inclinação severa
Textura do pelo	0= não arrepiado, 1=leve, 1,5= moderado, 2=intenso
Integridade da pele	0= sem alterações, 1=leve descamação, 1,5 descamação e perda de pelo, 2= descamação; perda de pelo e eritema
Atividade	0=normal, 1=letargia leve, 2=letargia moderada, 2=letargia grave

Fezes	0=normal, 0,5=levemente pastosa, 1=pastosa, 1,5= diarreia, 2= diarreia líquida secretora.
Sangue nas fezes	0= sem sangue 1= com sangue

#### 4.6. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram organizados em três grupos experimentais: grupo controle, grupo DECH+PBS (veículo) e grupo DECH+P1G10 (tratado). O grupo de controle consistiu em animais submetidos a transplante singênico, ou seja, transplante entre camundongos da linhagem C57BL/6 para C57BL/6. Esse grupo foi empregado como controle do regime de irradiação, garantindo que a mortalidade encontrada em outros grupos foi atribuída à DECH e não ao protocolo de condicionamento. O grupo veículo foi composto por animais submetidos a transplante alogênico entre camundongos da linhagem Balb/c para C57BL/6, seguido da administração de PBS 1X estéril. De forma semelhante, o grupo tratado com P1G10 também recebeu o transplante alogênico, diferenciando-se apenas quanto ao tratamento aplicado, conforme detalhado a seguir:

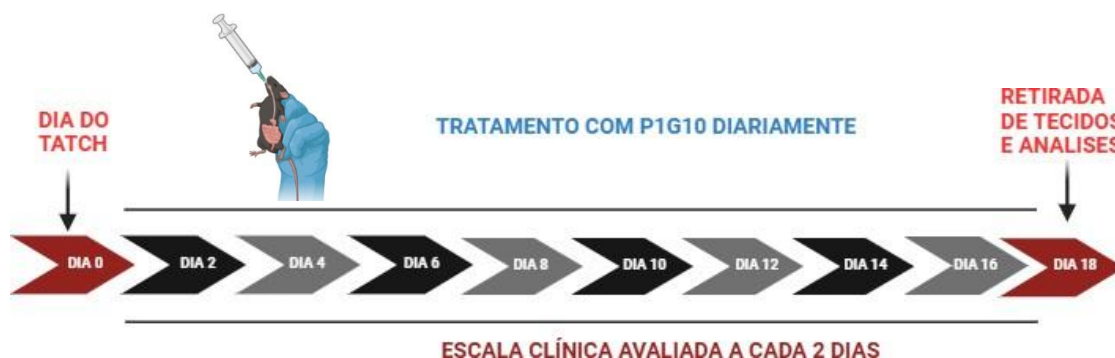


**Figura 8. Grupos experimentais utilizados nas análises:** Grupo controle, que recebeu células da mesma espécie (C57BL/6); Grupo DECH+PBS, que recebeu células de outra espécie (BALB/c) tratadas com PBS; e Grupo DECH+P1G10, que recebeu células de outra espécie (BALB/c) tratadas com P1G10. Figura do autor criada com Biorender- criada em: 04/01/25.

#### 4.7. TRATAMENTOS UTILIZADOS

Os animais foram alocados em três grupos experimentais: grupo controle, composto por animais submetidos a transplante singênico sem qualquer tipo de intervenção terapêutica; grupo DECH veículo, que recebeu solução de PBS 1X estéril; e grupo DECH tratado, orientado à administração da fração P1G10 na dose de 0,3 mg/kg, diluída em PBS 1X. A dose de 0,3 mg/kg foi definida com base em um experimento prévio de dose-resposta, no qual dois grupos

adicionais receberam 3,0 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente, e foram igualmente submetidos ao transplante. Os tratamentos foram realizados por gavage, de forma diária, com início no mesmo dia em que foi realizado o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (Fig. 9). Foi realizado um experimento de dose-resposta inicial, no qual foram utilizados dois grupos adicionais: DECH+P1G10 tratado com doses de 3,0 e DECH+P1G10 tratado com 30,0mg/kg.



**Figura 9. Tratamento com P1G10 0,3mg/kg diariamente por via oral.** Os tratamentos com P1G10 foram realizados por via oral desde o primeiro dia da indução até o último dia de experimentação. O grupo veículo recebeu PBS1X por mesma via de administração. Figura do autor- criada em: 13/01/25.

#### 4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Os animais foram eutanasiados quinze dias após a indução da doença, sendo coletados intestino, baço, fígado e medula. O protocolo para obtenção de células de baço compreendeu as seguintes etapas: as amostras foram maceradas e mantidas em RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguido de centrifugação a 1200rpm por 5 minutos à 4°C. As amostras foram então tratadas com ACK por cinco minutos, para remoção de hemácias. Em seguida as amostras foram ressuspensas em PBS-1x, recentrifugadas e então ressuspensas em 1mL de RPMI enriquecido com SFB. As células viáveis foram então contadas em câmara de Neubauer, marcadas com anticorpos fluorescentes e a amostra foi diluída em FACS Buffer para leitura. Em se tratando do isolamento das células do intestino, a porção relativa ao jejuno-íleo foi retirada e lavada com PBS para remoção do conteúdo intestinal. O tecido foi então cortado em pequenos pedaços e colocado em um Falcon contendo uma solução de PBS+5mM EDTA+10mM HEPES sendo alocadas por 20 minutos no homogeneizador de soluções (PhoenixLuferto®). Após este período a amostra foi centrifugada à 1500RPM/5'/20°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet remanescente foi então ressuspensado em solução de HEPES sendo novamente homogeneizado por 20 minutos e em seguida recentrifugado e o sobrenadante descartado. O pellet foi então lavado duas vezes com RPMI e centrifugado 1200RPM/10'/20°C, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuspensado em uma solução de 9mg de

Colagenase Tipo IV Sigma-Aldrich® em 10ml de meio RPMI, sendo mantida por 90 minutos no homogeneizador de soluções. A solução resultante foi filtrada em membrana cell strainer Falcon® de nylon (70µm) para remoção de quaisquer pedaços remanescentes, sendo a membrana lavada repetidamente com RPMI, para reduzir a perda de células viáveis. A amostra foi então centrifugada a 1500RPM/10'/20°C e o pellet foi ressuspenso em 1ml de meio RPMI para contagem na câmara de Neubauer conforme descrição prévia.

Para obtenção de células do fígado, as amostras foram maceradas e acondicionadas em um Falcon de 50mL com solução de EGTA 2,4M (em 450mL de H<sub>2</sub>O + 1,42M NaCl + 67mM KCl + 100mM Hepes) sendo então colocadas em um homogeneizador de soluções (PhoenixLufasco®) por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas à 1200RPM/5'/4°C, sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso na mesma solução de EGTA 2,4M sendo novamente centrifugadas à 1200RPM/5'/4°C, sobrenadante descartado e então ressuspendidas em uma solução de albumina 0,5% (junto à NaCl 67mM; KCl 6,7mM; Hepes 100mM; em H<sub>2</sub>O). Em seguida as células foram marcadas através do protocolo de marcação de superfície celular e intracelular já descrito. A medula somente foi utilizada para marcação de H2Db e H2Dd para avaliação de quimerização, sendo estes haplotipos de MHC de C57BL/6j e Balb-c, respectivamente. Para tanto, as células foram obtidas através da lavagem de fêmurs dos camundongos, sete dias após a indução, em seguida, foi utilizado o protocolo de marcação de superfície celular.

Na marcação de superfície celular foram adicionados 20µl de mix 1, 2 e 3 (TABELA 4), para cada 1x10<sup>6</sup> células, este mix foi preparado em *Facs buffer* (PBS/BSA 1%) de acordo com as diluições dos anticorpos propostos pelo fabricante. As amostras foram incubadas por 30 minutos e então lavadas individualmente com 200µl de PBS1x 4°C e centrifugadas a 2000RPM/5'/4°C. Em seguida foram ressuspendidas em 300µl de *Facs buffer*.

Na marcação intracelular as amostras foram ressuspendidas em 200µl de formaldeído 2% e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Este passo foi realizado para que a primeira marcação pudesse ser fixada. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000RPM/5'/4°C e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram incubados em brefeldina por 3 horas nos mix's com marcação para citocinas. Posteriormente foram centrifugados e ressuspendidos em 300µl de BD *Perm/Wash*<sup>TM</sup> buffer e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 2000 RPM/5'/4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado em seguida 20µl dos anticorpos diluídos em de BD *Perm/Wash*<sup>TM</sup> buffer e incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com

200µl de PBS1x e centrifugadas a 2000RPM/5'/4°C. A amostra foi, então, ressuspensa em 300µl de PBS/BSA 1% e lidas em leitor FacsScalibur®.

Os dados obtidos pelo leitor FacsScalibur® foram processados utilizando o *software* *FlowJo*® versão 11, com a análise de cada marcador realizado de acordo com as coleções contidas em suas respectivas fichas de dados.

**Tabela 2. Lote e fabricante dos anticorpos usados na Citometria de Fluxo**

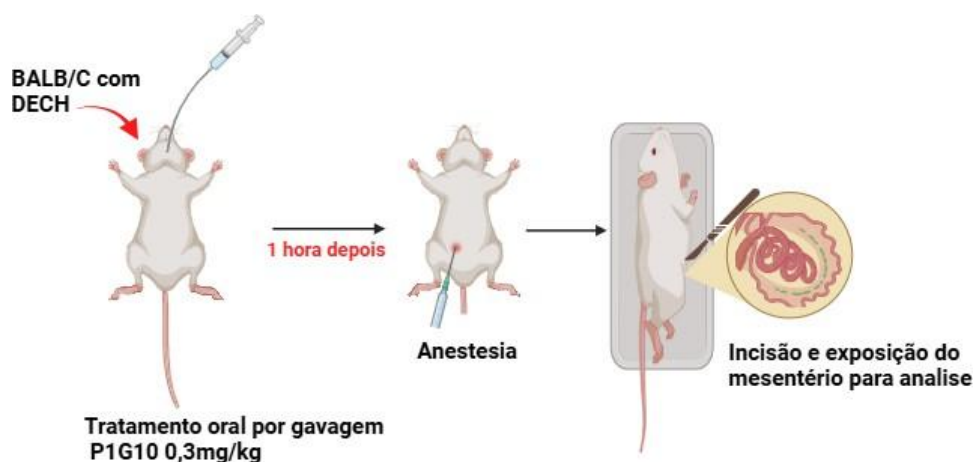
Anticorpo	Lote	Fabricante
Alexa 488	12480182	eBioscience
PerCP/Cyc5.5	551071	Pharmingen
Pe-Cy7	128018/560527	BioLend/Biolend
PE	55392/32008	BioLend/Biolend
APC	141708/554468	BioLend/Biolend
V421	563387/123137	BioLend/Biolend
V500	56127	BioLend/Biolend

#### 4.9. ANÁLISE DO RECRUTAMENTO CELULAR POR MICROSCOPIA INTRAVITAL

A análise por microscopia intravital permite compreender, em tempo real, a dinâmica e a interação celular no ambiente intestinal (HONDA et al., 2023). Para a realização do experimento, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6j-GFP<sup>+</sup> como doadores de células, destinados a animais receptores da linhagem Balb/c. As células foram distribuídas de acordo com o protocolo descrito anteriormente no tópico referente à indução da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). No sétimo dia após a indução da DECH, os animais foram tratados com a fração proteolítica P1G10 (0,3 mg/kg) administrada por via oral, uma hora antes da análise. Os animais do grupo controle receberam, no mesmo intervalo de tempo, solução estéril de PBS 1X. Para o procedimento experimental, os camundongos foram anestesiados com xilazina (25ul) e cetamina (12,5ul) e, em seguida, posicionados cuidadosamente em decúbito lateral em uma placa mantida a 37°C. Uma incisão foi realizada na parede abdominal, permitindo a exposição cuidadosa do mesentério e das alças intestinais. Essa exposição foi conduzida sobre uma placa transparente, de modo a garantir a passagem de luz necessária para a análise microscópica (Fig. 10). Com o objetivo de preservar a hidratação do mesentério durante o procedimento, a placa foi revestida com papel filtro, sendo o mesentério umedecido com solução de PBS 1X sempre que necessário (HASHIMOTO et al., 2018; HASHIMOTO et al., 2021). Utilizou-se uma lente objetiva de 20x acoplada a um específico confocal intravital (Nikon, modelo ECLIPSE 50i, objetiva 20x) para uma observação detalhada da microvasculatura mesentérica e intestinal. As imagens obtidas foram capturadas por uma

câmera integrada e armazenadas para análise subsequente utilizando o software Fiji-ImageJ, em conjunto com o plugin NIS Elements-Nikon.

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento aplicado no recrutamento celular. Para alcançar esse propósito, uma análise foi realizada de maneira sistemática, conforme descrito a seguir: os leucócitos classificados como rolando foram definidos como aquelas células que se deslocavam em uma velocidade inferior aos eritrócitos dentro de um vaso específico. O número de leucócitos rolando foi determinado pela contagem das células que atravessavam o vaso em intervalo de um minuto. Por outro lado, os leucócitos foram considerados aderentes quando permaneceram imóveis no mesmo local por um período igual ou superior a 30 segundos em um vaso de 50  $\mu\text{m}$  de largura por 100 $\mu\text{m}$  de comprimento. Todas essas avaliações foram realizadas utilizando imagens previamente gravadas, garantindo maior precisão e confiabilidade dos resultados (COSTA et al., 2022).



**Figura 10. Procedimento para análise de recrutamento celular:** No sétimo dia após a indução da GVHD, os animais receberam tratamento oral por gavagem contendo P1G10 (0,3mg/kg) ou veículo, administrado uma hora antes do procedimento. Antes da incisão abdominal, os animais foram anestesiados, e o mesentério exposto para possibilitar a visualização das vênulas mesentéricas. Figura do autor criada com o Biorender- criada em: 14/01/25.

#### 4.10. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Após quinze dias de indução da DECH, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Primeiro, foi retirado o soro dos animais pela veia-cava inferior, posteriormente foram retirados o coração, intestino e fígado. O sangue dos grupos experimentais foi centrifugado por 10 minutos, a 1.750 rpm a 4°C, obtendo assim o soro para análise. O coração foi previamente seccionado e o ápice foi utilizado para a análise. O intestino foi retirado, limpo e a parte de interesse jejuno-íleo foi pesada obtendo 100mg da porção. Também obtivemos 100mg do fígado retirado do lobo esquerdo. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram aferidos nos homogenatos do soro e órgãos através do ensaio de Enzyme-

linked immunosorbent assay (ELISA). A preparação do tampão de extração de citocina/quimiocinas é realizada através da adição dos seguintes reagentes ao PBS 1x: antiproteases 0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetônio clorídrico, 10 mM EDTA, aprotinina A 0,05% de Tween 20, BSA e NaCl. Seguido da adição do tampão de extração o tecido é triturado com o auxílio do homogeneizador (IKA® T10 Basic Ultra-Turrax®). O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para o ELISA. O ensaio ELISA seguiu as diretrizes fornecidas pelo fabricante (R&D System), e as leituras das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro a 490 nm. O aparelho determinou a absorbância das amostras comparando-as com a curva padrão de diluição sendo que a concentração do primeiro ponto foi definida pelo fabricante da citocina/quimiocina. Foram analisadas as citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-10, e as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5.



**Figura 11. ELISA do tipo sanduiche.** A pipetagem realizada em placa de 96 poços e leitura em espectrofotômetro. Figura do autor criada com o Biorender- criada em: 10/12/24.



**Figura 12. Curva Padrão para ELISA:** exemplo de uma diluição seriada aplicada para a construção da curva padrão, que serve como referência para a leitura no espectrofotômetro. Figura do autor criada com o Biorender- criada em: 10/12/24

**Tabela 3. Lote e fabricante dos anticorpos usados no ELISA.**

Anticorpo	Lote	Fabricante
TNF	DY410-05	R&D Systems
INF- $\gamma$	DY417-05	R&D Systems
IL-10	DY485-05	R&D Systems
CCL2	DY479-05	R&D Systems

CCL3	DY450-05	R&D Systems
CCL5	DY478-05	R&D Systems

#### 4.11. ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

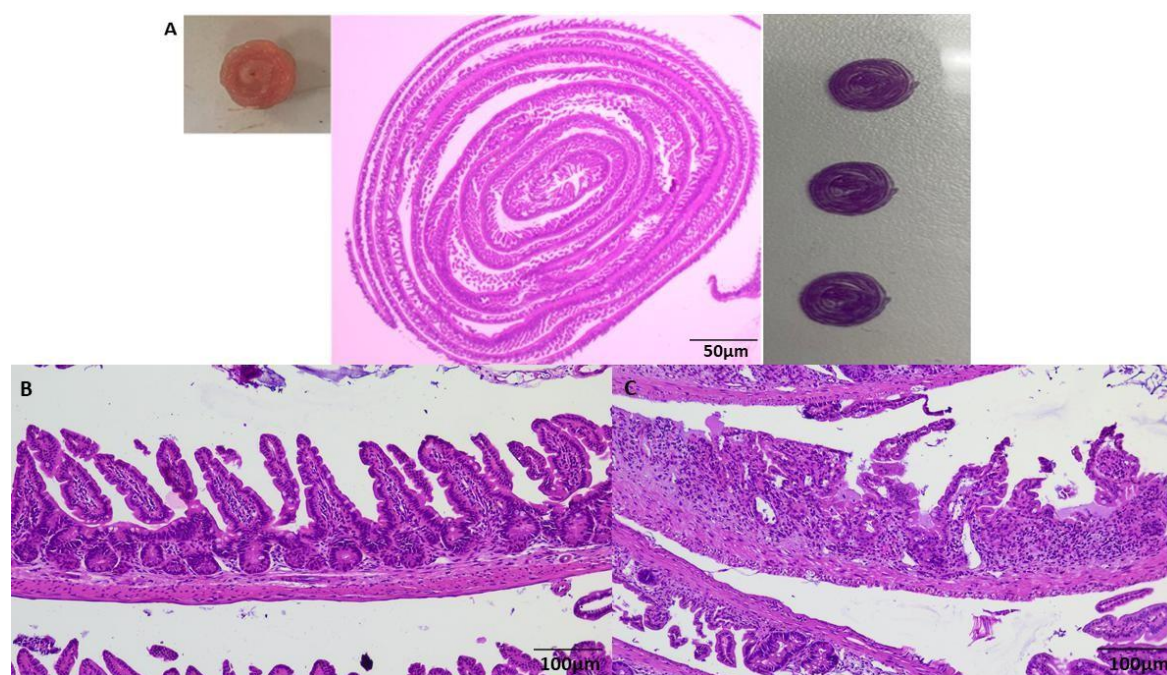
No décimo oitavo dia após a indução da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), foi realizada a eutanásia dos animais. Após esse procedimento, foram coletadas amostras de jejuno-íleo e fígado dos grupos de animais, controle, veículo e tratados com P1G10. Os intestinos foram completamente removidos e lavados com PBS-1x para eliminar o conteúdo intestinal. Em seguida, as porções correspondentes ao jejuno-íleo foram separadas, abertas longitudinalmente e organizadas em espirais, conforme a técnica descrita por Arantes & Nogueira (1997). Essas espirais (Fig. 13) foram acondicionadas em cassetes plásticos e fixadas em PFA 4% por 24 horas, sendo posteriormente transferidas para álcool 70%. O processamento das amostras envolveu desidratação progressiva, passando por concentrações de etanol de 80%, 90% e absoluto, com cada etapa durando 30 minutos. Em seguida, foi realizada a diafanização utilizando xilol, com duas passagens de 20 minutos cada. As amostras foram então infiltradas em parafina líquida. Os blocos de parafina resultantes desse processo foram usados para a obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas, que passaram por desparafinação com xilol e etanol (duas passagens de 20 minutos no xilol e passagens de 2 minutos para cada concentração decrescente de etanol, como descrito anteriormente). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina para análise histopatológica subsequente. As amostras de fígado seguiram o mesmo procedimento descrito para as amostras intestinais.

- **Jejuno-íleo:** Nas secções de jejuno-íleo coradas com hematoxilina e eosina (H&E), foram examinadas as seguintes estruturas: epitélio, lâmina própria, camada muscular e serosa. As análises foram realizadas utilizando microscopia óptica com aumentos de 10x, 20x e 40x. A pontuação obtida no escore histopatológico é contabilizada pela soma das categorias de análise de (WILLIAMS et al., 2007). A pontuação dos escores é realizada de acordo com a classificação descrita na tabela a seguir:

**Tabela 4. Critérios histológicos avaliativos das secções de jejuno-íleo.**

Escala	Epitélio	Lâmina própria	Muscular e serosa
0	Ausência de alterações visíveis.	Estrutura preservada sem alterações perceptíveis.	Sem alterações detectáveis.
1	Alterações discretas de resposta celular.	Hiperemia discreta e edema leve, com	Ilfiltrado discreto de células mononucleares

		infiltração leve de células mononucleares	e edema leve da serosa.
2	Perda parcial da arquitetura das criptas e epitélio.	Hiperemia e edema moderados com infiltração de células mononucleares.	Infiltrado moderado e focal de células mononucleares nas camadas muscular e serosa com edema moderado.
3	Hiperplasia e alterações nucleares proliferativas.	Hiperemia intensa e edema acentuado, com infiltração inflamatória significativa e alterações na arquitetura das vilosidades.	Infiltração intensa de células mononucleares com sinais evidentes de inflamação nas camadas muscular e serosa.



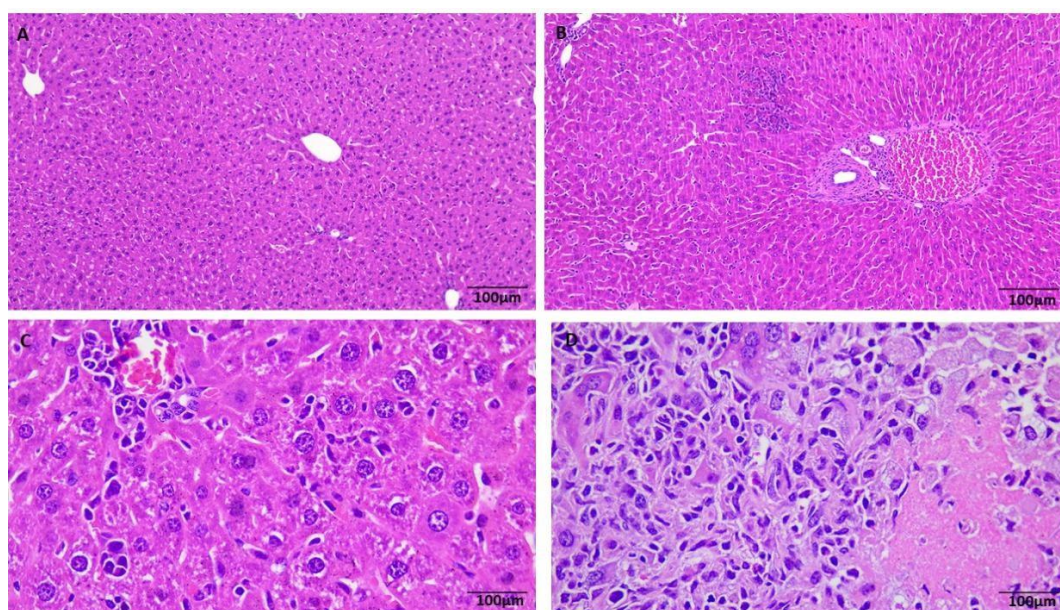
**Figura 13. Representação dos critérios avaliados na análise histológica no jejuno-íleo.** (A) Preparação do rocombole para confecção das lâminas histológicas, a direita imagem histologica da lâmina confeccionada. (B) Foto histológica de intestino avaliado com graduações mínimas. (C) Foto histológica de intestino avaliado com graduação máxima com celuridade aumentada a lâmina própria que funde-se com a submucosa devido à destruição das vilosidades, edema e congestão, além da presença de intensas alterações inflamatórias.

- Fígado:** Para a avaliação histopatológica do fígado, é retirado o todo o fígado e acondicionado sob as mesmas condições apresentadas anteriormente (jejuno-íleo). Entretanto, a análise atende a outros critérios de avaliação. Neste órgão são analisados os lóbulos hepáticos, veias centro-lobulares e o espaço porta, levando em consideração as características do parênquima e do estroma do órgão. Os animais foram classificados com base no somatório desses critérios, atingindo um total máximo de 6 pontos (GARCIA et al., 2013; CANESSO et

al., 2014). É importante ressaltar que todas análises são realizadas por um patologista através de teste cego.

**Tabela 5. Critérios histológicos avaliativos do fígado**

Escala	Parênquima	Infiltrado Inflamatório
0	Sem alterações perceptíveis	Ausente ou raro.
1	Alterações discretas com foco na vaculização citoplasmática e eosinofílica.	Infiltrado discreto na região periportal.
2	Alterações na morfologia celular, vacuolização difusa, alterações nucleares.	Infiltrado discreto ou moderado na região periportal e intralobular.
3	Morte hepatocitária, vacuolização difusa, alterações morfológicas celulares e mudança na conformação do núcleo,	Infiltrado inflamatório nas áreas periportal e intralobular.



**Figura 14. Representação dos critérios avaliativos na análise histológica do fígado.** (A) Foto histológica do fígado avaliado com graduações mínimas. (B) e (C) Fotos histológicas do fígado com congestão vascular e infiltrado de células inflamatórias na região periportal e centro lobular. (D) Foto histológica do fígado com alterações sugestivos de necrose e alargamento dos sinusóides.

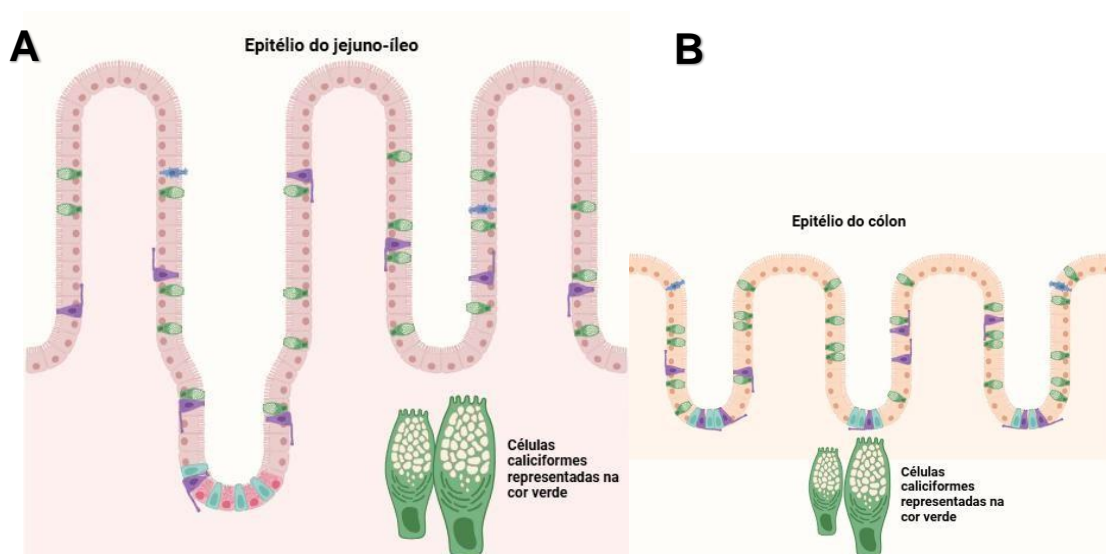
#### 4.12. ANÁLISE DAS CÉLULAS CALICIFORMES DO JEJUNO-ÍLEO E CÓLON POR COLORAÇÃO PAS

A quantificação do número de células caliciformes é amplamente realizada em segmentos intestinais por meio da coloração pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS), técnica amplamente empregada tanto em pesquisas científicas quanto em diagnósticos clínicos. O muco produzido pelas células caliciformes no intestino e no cólon desempenha funções

essenciais para a proteção e o bom funcionamento do trato gastrointestinal (MELLO et al., 2012).

Para esta avaliação, os segmentos de jejuno, íleo e cólon foram submetidos às mesmas condições de preparo aplicados nas análises histopatológicas, diferenciando-se apenas pelo uso da coloração específica. A coloração PAS é especialmente empregada para evidenciar estruturas que apresentam alta concentração de macromoléculas de carboidratos, como glicogênio e glicoproteínas neutras. Esse método permite a visualização de mucosubstâncias produzidas por células caliciformes, que são glândulas exócrinas unicelulares, além de destacar telas conjuntivas e a membrana basal (GARTNER; HIATT, 2003). As regiões marcadas pela coloração apresentam um tom púrpura-magenta, permitindo a identificação precisa das células caliciformes.

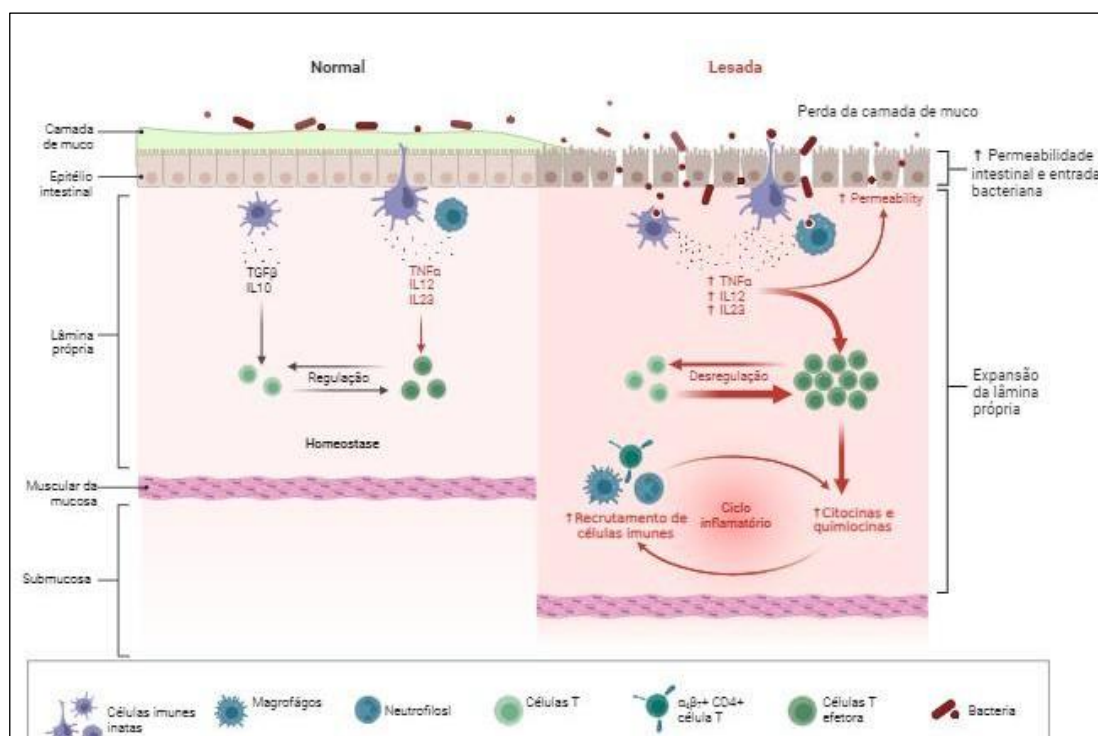
Para a quantificação das células caliciformes no intestino, foram capturadas 15 imagens por animal, sendo analisadas dois campos por imagem, com a contagem de 10 vilosidades em cada campo. No caso do cólon, foram capturadas 10 imagens por animal, também com a análise de dois campos por imagem, contendo 10 criptas por campo. As contagens foram realizadas utilizando o *software ImageJ*.



**Figura 15. Epitélio intestinal e colônico com as células caliciformes.** (A) Representação do epitélio do jejuno-íleo com as células caliciformes em cor verde (B) Representação do epitélio do cólon com as células caliciformes em cor verde. Adapta do Biorender.com

#### 4.13. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

A permeabilidade intestinal aumentada é uma característica bem documentada na fisiopatologia da doença enxerto-contra-hospedeiro (NOTH, 2011; NALLE, 2019) (FIGURA 16). Para avaliar se houve translocação de micro-organismos do intestino para o peritônio, fígado e, posteriormente, corrente sanguínea, realizou-se o teste de translocação bacteriana. A análise teve início após a morte do primeiro animal do grupo veículo, que aconteceu no sétimo dia após a indução da doença. Para o procedimento, os animais foram anestesiados com uma combinação de Xilazina (80%) e Cetamina (20%). Em ambiente de fluxo laminar, o sangue foi coletado por decapitação, seguido pela obtenção da lavagem peritoneal, posteriormente foi extraída uma amostra de 100 mg de fígado, macerado em PBS 1X estéril. As amostras coletadas foram cultivadas em duplicata: o primeiro cultivo foi realizado sem diluição e o segundo com uma diluição de 1:10 em PBS 1X estéril. Todo o material coletado foi submetido ao cultivo para detecção de crescimento microbiano quantitativo. As amostras de sangue, lavagem peritoneal e fígado foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura não seletivo Mueller-Hinton, o plaqueamento foi realizado utilizando alça bacteriológica de 10ul. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 32 horas, após foi realizada a contagem manual.



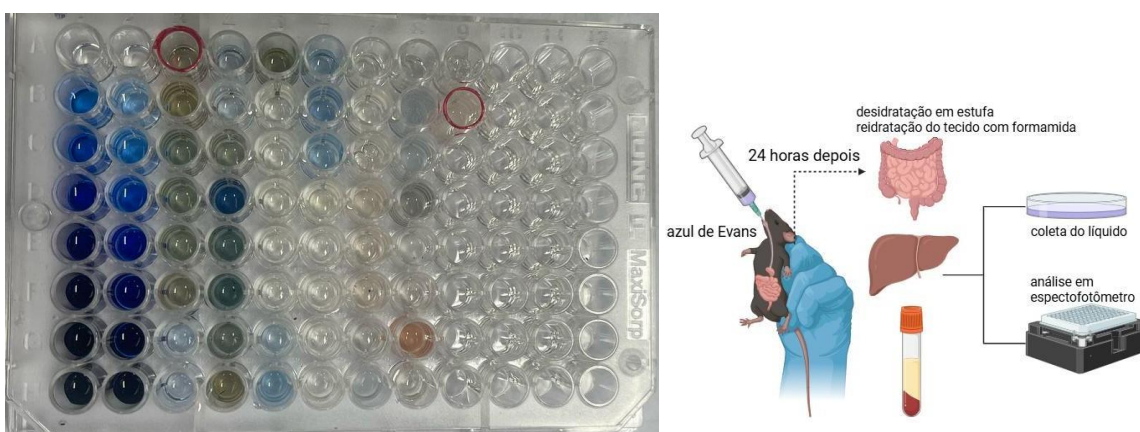
**Figura 16. Representação do processo de translocação bacteriana por perturbação do epitélio intestinal.** Na doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH), a desregulação intestinal resulta em danos ao epitélio intestinal e na perda da produção de muco devido à redução das células caliciformes que o compõem. O rompimento da

barreira intestinal pode, conseqüentemente, favorecer a ocorrência de infecções graves, como a sepse. Adaptada do Biorender.com

#### 4.14. PERMEABILIDADE INTESTINAL

Para avaliação da permeabilidade intestinal, os animais foram previamente gavados, no dia anterior à eutanásia, com 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de azul de Evans a 125 mg/mL, preparada em solução salina estéril. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e tecidos (fígado e intestino) foram coletadas. O sangue foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C para obtenção do soro e diluído na proporção 1:2 em formamida. Para os tecidos, após desidratação em estufa (37 °C por 24 horas), foi adicionado um volume de formamida equivalente a 10 vezes o peso seco (em mg) do tecido, permanecendo em extração por 24 horas à temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas (50  $\mu\text{L}$ ) em placa de 96 poços e analisadas com leitura da absorbância a 620 nm em espectrofotômetro. A concentração do corante nas amostras foi determinada por interpolação em curva padrão, construída a partir de diluições seriadas da solução-mãe, variando de 400  $\mu\text{g/mL}$  até diluições subsequentes. A permeabilidade foi expressa pela fórmula:

Permeabilidade =  $C \times V / \text{peso(mg)}$ , onde **C** representa a concentração de corante na amostra ( $\mu\text{g/mL}$ ), **V** o volume da solução (mL), e o peso corresponde à massa do tecido ou peso corporal do animal em miligramas. O valor obtido foi posteriormente multiplicado por um fator de correção referente ao volume inicial total utilizado na extração de cada amostra, garantindo a padronização dos resultados entre os grupos experimentais.



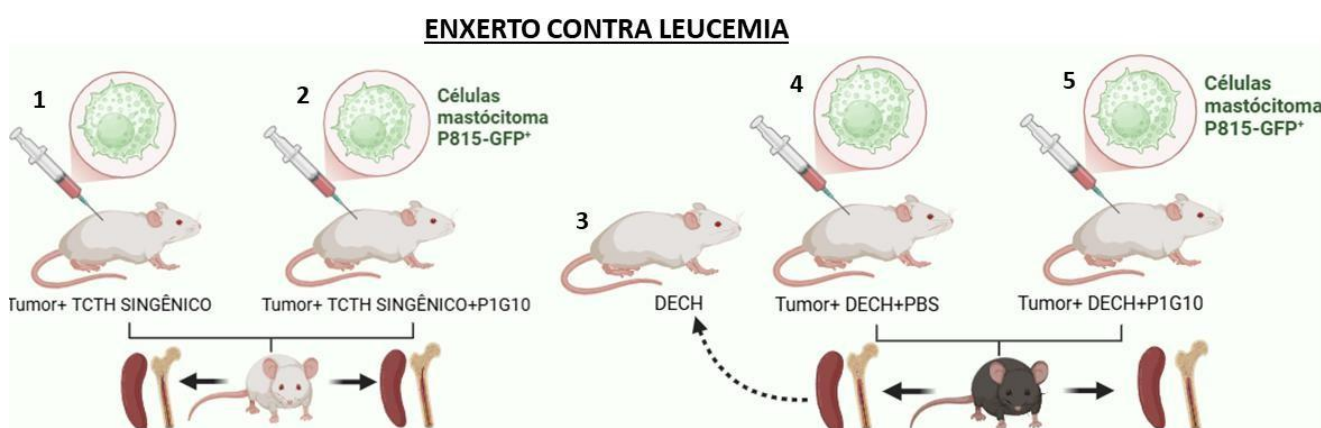
**Figura 17- Placa lida em espectrofotômetro com as amostras do intestino, fígado e soro com esquema experimental.** Placa de 96 poços com a curva padrão em duplicata e as amostras processadas que foram posteriormente lidas nos espectrofotômetro para obtenção da absorbância. Da esquerda para direita duas primeiras colunas, curva padrão em duplicata, amostras da intestino, fígado e soro. Figuras do autor criada com o Biorender-criada em 23/03/25.

#### 4.15. RESPOSTA DO ENXERTO CONTRA LEUCEMIA (ECL ou GVL)

Para avaliar se o tratamento com P1G10 interfere na resposta antileucêmica esperada com a terapia de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (TCTH), foi realizada uma indução tumoral utilizando células de mastocitoma P815-GFP<sup>+</sup>. O mastocitoma é uma neoplasia maligna, causada pela proliferação descontrolada e excessiva de mastócitos, células imunológicas que desempenham um papel importante na resposta imune, principalmente por meio da liberação de histamina em processos inflamatórios e alérgicos (GYURKOCZA, 2010).

O tumor induzido pelas células P815-GFP<sup>+</sup> é tratado, em grande parte, por meio do TCTH, uma terapia que visa restaurar o sistema imunológico do paciente. Um dos mecanismos curativos associados ao TCTH é a resposta do enxerto-contratumor, conhecido como *Graft-versus-Leukemia (GVL)*, na qual busca-se a erradicação da doença residual mínima (DRM) que pode persistir após a terapia inicial (TESHIMA; HASHIMOTA, 2023; BLEARHLEY; BIERNACKI, 2022).

Os animais utilizados nesse experimento foram da linhagem BALB-c divididos em 5 grupos experimentais conforme descreve a figura 18: Tumor P815-GFP<sup>+</sup> + transplante singênico-(Controle do tumor) - Tumor P815-GFP<sup>+</sup> + transplante singênico + P1G10 0,3 mg/kg- DECH sem tumor (Controle DECH) - Tumor P815-GFP<sup>+</sup> + DECH- Tumor P815-GFP<sup>+</sup>+ DECH + P1G10 0,3 mg/kg.



**Figura 18. Desenho experimental dos grupos do experimento enxerto contra leucemia (ECL).** Os grupos foram divididos em TUMOR+TCTH SINGÊNICO, TUMOR+TUMOR SINGÊNICO+P1G10, DECH, TUMOR+DECH +PBS e TUMOR+DECH+P1G10 para averiguar se a fração pode interferir no ECL. Figura do autor criada com o Biorender- criada em: 26/01/25.

#### 4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

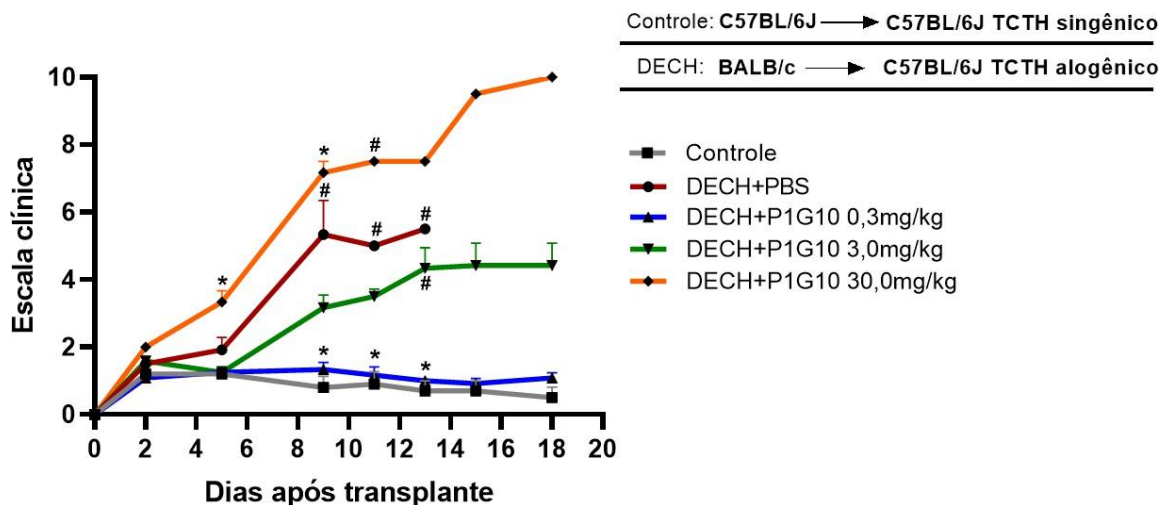
As análises estatísticas foram planejadas e executadas com base nas recomendações metodológicas estabelecidas por Curtis e colaboradores (2018). Inicialmente, valores discrepantes (*outliers*) foram identificados por meio do teste de Grubbs ( $P < 0,05$ ) e, quando identificados, excluídos do conjunto de dados. Em seguida, a distribuição normal dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Nos casos em que a normalidade não foi confirmada, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as análises subsequentes. Para a avaliação dos parâmetros clínicos, variação de peso, análise histopatológica, permeabilidade intestinal e do ECL foram aplicados o *one-way* ANOVA. A análise de sobrevida foi conduzida utilizando o teste de Log-rank. Nos experimentos envolvendo microscopia intravital, citometria de fluxo, morfometria do baço e do cólon, dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA, análise de PAS e translocação bacteriana, as comparações entre os grupos (DECH+PBS vs. DECH+P1G10) foram realizadas por meio do *test t*. Todos os testes estatísticos foram executados com um nível de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ) e os dados foram expressos como média dos valores  $\pm$  erro padrão da média. Para a elaboração dos gráficos e a realização das análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.1.

## 5. RESULTADOS

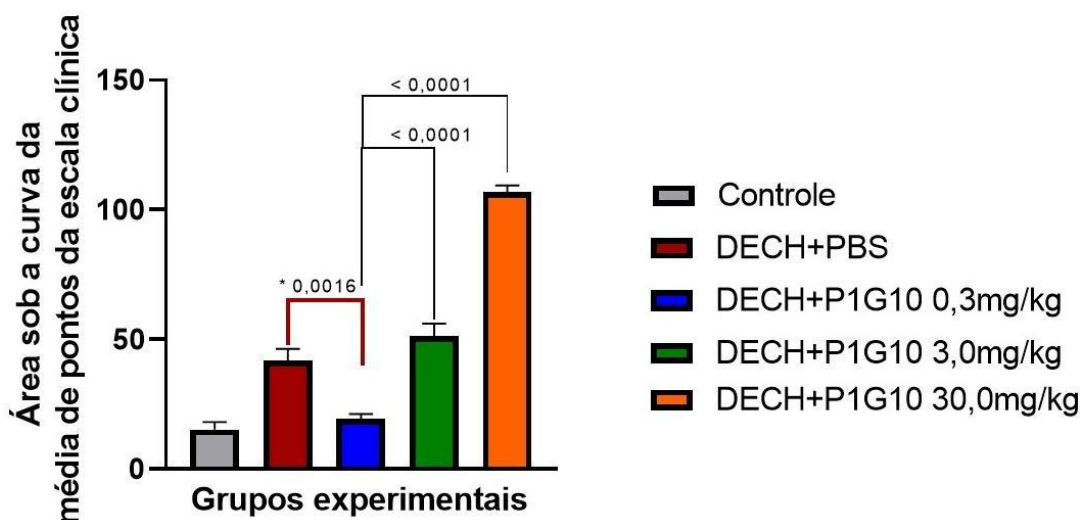
### 5.1. EFEITO DA P1G10 NA ESCALA CLÍNICA DE CAMUNDONGOS COM DECH

Foi conduzido um experimento preliminar de dose-resposta com o objetivo de determinar a dose de P1G10 mais eficaz para o tratamento de camundongos acometidos pela doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH). As doses testadas foram 0,3 mg/kg, 3,0 mg/kg e 30,0 mg/kg, previamente selecionadas com base em estudos anteriores realizados em modelos murinos de colite tratados com a mesma fração proteolítica (P1G10) (ALBUQUERQUE et al., 2020). A avaliação de parâmetros clínicos foi realizada de acordo com a Tabela 1 descrita em materiais e métodos. Após a análise dos dados, constatou-se que a dose de 0,3 mg/kg mostrou os melhores efeitos terapêuticos, evidenciados pela redução nas pontuações da escala clínica, mantendo a pontuação semelhante aos animais controles, submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) do tipo singênico. Em contrapartida, os animais DECH+VEÍCULO (PBS) apresentaram alterações progressivas dos sinais clínicos apresentando pontuações superiores aos grupos controle, DECH+P1G10 0,3mg/kg e DECH+P1G10 3,0mg/kg. Entretanto, os animais submetidos a doença que receberam P1G10 na dose de 30,0mg/kg obtiveram pontuação superior aos animais DECH+PBS (Fig.19).

A análise da área sob a curva (AUC) da escala clínica, calculada com base na progressão dos sinais clínicos ao longo dos dias após o transplante (Fig. 20), revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. A menor AUC foi observada no grupo tratado com P1G10 na dose de 0,3 mg/kg, indicando uma redução na carga clínica total da doença ao longo do tempo, quando comparado ao grupo DECH+PBS. Em contraste, as doses mais elevadas de P1G10 (3,0 mg/kg e 30,0 mg/kg) apresentaram AUCs significativamente maiores ( $p < 0,0001$ ), refletindo uma piora clínica progressiva. Notadamente, a dose de 30,0 mg/kg foi associada à maior AUC entre todos os grupos, indicando não apenas ausência de efeito terapêutico, mas também uma possível exacerbação dos sinais clínicos, o que sugere um efeito deletério em doses mais altas.



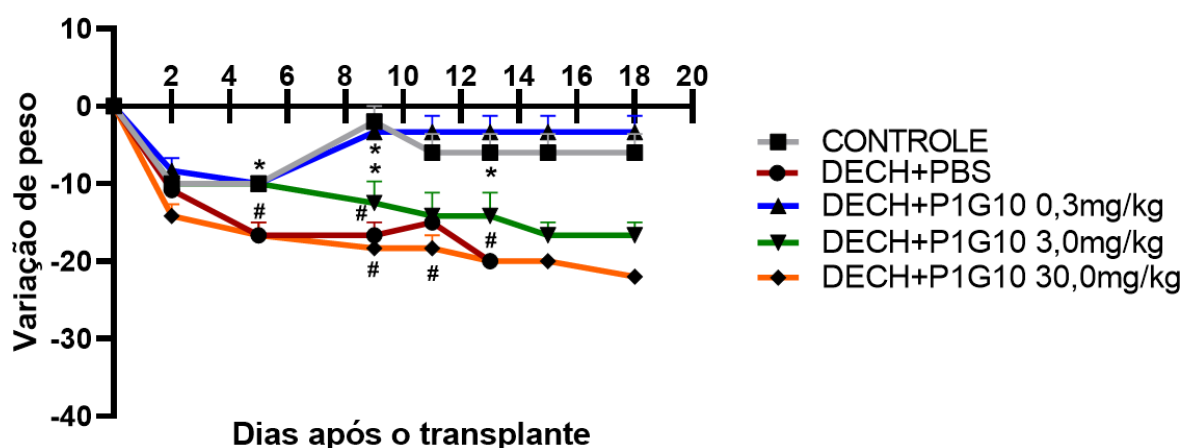
**Figura 19.** A dose de 0,3mg/kg de P1G10 protegeu os camundongos com DECH da evolução dos parâmetros clínicos da doença. A DECH foi induzida por meio da transferência de células da medula óssea e esplenócitos provenientes de camundongos doadores das linhagens BALB/c e C57BL/6. Os animais receptores que obtiveram células de doadores singênicos (C57BL/6 para C57BL/6) não apresentaram desenvolvimento da doença, sendo classificados como grupo controle. Por outro lado, os camundongos que receberam células alogênicas (BALB/c para C57BL/6) manifestaram a doença, sendo designados como grupo DECH. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: grupo controle (n=5); grupo veículo DECH+PBS (n=6); grupo DECH+P1G10 0,3mg/kg (n=6); grupo DECH+P1G10 3,0mg/kg (n=6); e grupo DECH+P1G10 30,0 mg/kg (n=6). Após o procedimento de transplante, os animais foram avaliados a cada 48 horas para monitoramento dos sintomas clínicos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM # e \* $P < 0.05$  quando comparados ao grupo controle e ao grupo DECH, respectivamente.



**Figura 20.** Área sob a curva do gráfico de evolução dos sinais clínicos nos diferentes grupos experimentais. A administração da fração proteolítica P1G10 em diferentes doses modificou a resposta clínica na DECH. Destaca-se que a dose de 0,3 mg/kg apresentou o menor valor de área sob a curva, indicando maior eficácia na redução dos sinais clínicos da doença. Esse achado sugere uma relação não linear dose-resposta, na qual o aumento da dose não necessariamente melhora o efeito terapêutico. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: grupo controle (n=5); grupo veículo DECH+PBS (n=6); grupo DECH+P1G10 0,3mg/kg (n=6); grupo DECH+P1G10 3,0mg/kg (n=6); e grupo DECH+P1G10 30,0 mg/kg (n=6). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM # e \* $p < 0.05$  quando comparados ao grupo controle e ao grupo DECH, respectivamente.

## 5.2 EFEITO DA P1G10 SOBRE A VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS COM DECH

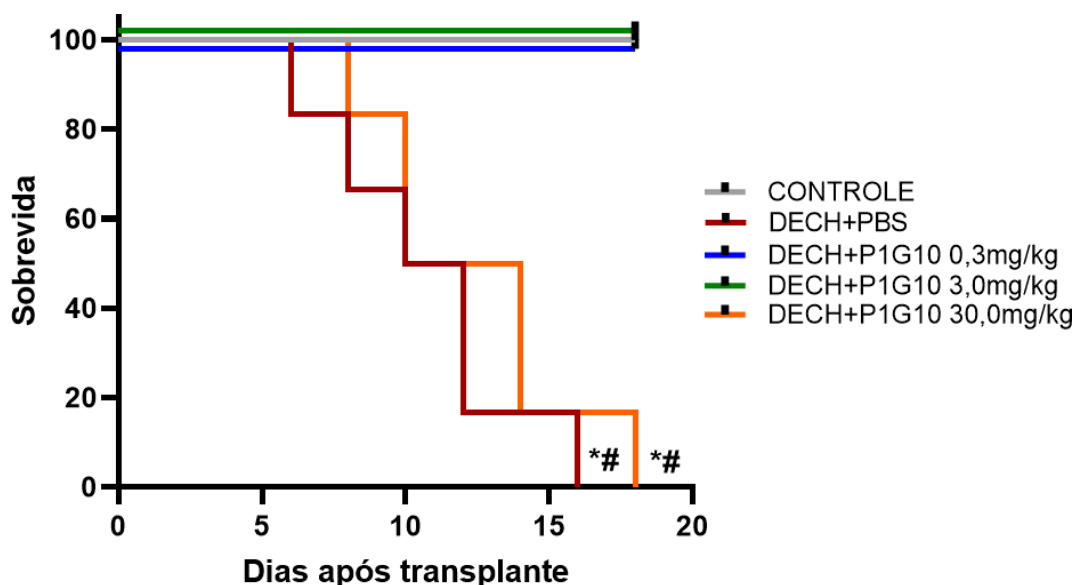
O parâmetro de variação de peso destaca-se como um indicador particularmente relevante na fisiopatologia da DECH, uma vez que camundongos que evoluem para óbito geralmente apresentam perda de peso significativa, variando entre 10% e 20%. No experimento de dose resposta, os animais DECH+ VEÍCULO (PBS) não recuperaram o peso em nenhum momento. No entanto, os animais que receberam a dose de 0,3mg/kg conseguiram reverter a perda de peso inicial de maneira símile ao grupo controle, mantendo estável até o final da avaliação dos parâmetros clínicos. Os grupos tratados nas doses de 3,0 mg/kg e 30,0mg/kg obtiveram variação de peso negativa até o final do experimento (Fig.21).



**Figura 21.** Os camundongos com DECH tratados com 0,3mg/kg de P1G10 não apresentaram variação ponderal de peso durante a avaliação dos parâmetros clínicos. A análise da variação de peso corporal demonstrou que o grupo tratado com P1G10 na dose de 0,3 mg/kg (DECH+P1G10 0,3 mg/kg) manteve um perfil de peso estável, sem oscilações significativas, em contraste com os grupos submetidos a doses maiores 3,0 mg/kg e 30,0 mg/kg apresentaram perda de peso acentuada. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: grupo controle (n=5); grupo veículo DECH+PBS (n=6); grupo DECH+P1G10 0,3mg/kg (n=6); grupo DECH+P1G10 3,0mg/kg (n=6); e grupo DECH+P1G10 30,0 mg/kg (n=6). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM # e \* $p < 0.05$  quando comparados ao grupo controle e ao grupo DECH, respectivamente.

### 5.3. EFEITO DA P1G10 NA SOBREVIDA DE ANIMAIS COM DECH

A sobrevivência dos animais tratados com a dose de 0,3 mg/kg de P1G10 foi de 100% nos vinte dias após o TCTH alogênico. De maneira semelhante, os camundongos tratados com a dose de 3,0 mg/kg também obtiveram sobrevivência total. No entanto, observou-se que, nessa dose, houve um aumento nas variações dos parâmetros clínicos descritos na Tabela 1 e apresentados na Fig. 18. Por outro lado, a dose de 30,0 mg/kg não foi eficaz na proteção dos camundongos, resultando no início da mortalidade a partir do oitavo dia e culminando em morte total dos animais até o décimo oitavo dia. Em comparação, os camundongos que receberam apenas o veículo (PBS) tiveram início da mortalidade no sétimo dia, com 100% de morte registrada até o décimo sexto dia (Fig. 22).



**Figura 22. Sobrevivência dos grupos controle, DECH+VEÍCULO (PBS), DECH+P1G10 0,3mg/kg, DECH+P1G10 3,0mg/kg e DECH+P1G10 30,0mg/kg.** Os resultados demonstraram que a administração de P1G10 na dose de 0,3 mg/kg foi capaz de prevenir significativamente a mortalidade em 100%. Todos os animais tratados apenas com veículo (DECH+PBS) morreram até o 16º dia pós-transplante, evidenciando a gravidade do quadro não tratado. De forma semelhante, o grupo que recebeu a dose mais elevada de P1G10 (30,0 mg/kg) apresentou óbito de todos os indivíduos até o 18º dia, sugerindo um possível efeito dose-dependente ou limitação terapêutica em concentrações mais altas. Número de animais por grupo- controle n=5 DECH+PBS e P1G10 (0,3/3,0 e 30,0mg/kg) n=6. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM # e \* $p < 0.05$  quando comparados ao grupo controle e ao grupo DECH, respectivamente por Long rank test.

Com base no experimento dose-resposta, que avaliou a evolução dos parâmetros clínicos e a sobrevivência dos animais com DECH a dose de 0,3 mg/kg de P1G10 foi selecionada para os experimentos subsequentes. Essa decisão fundamentou-se nos resultados superiores observados nesse grupo, que apresentou melhora significativa nos parâmetros analisados em comparação com outras doses testadas.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T NO BAÇO DE CAMUNDONGOS COM DECH

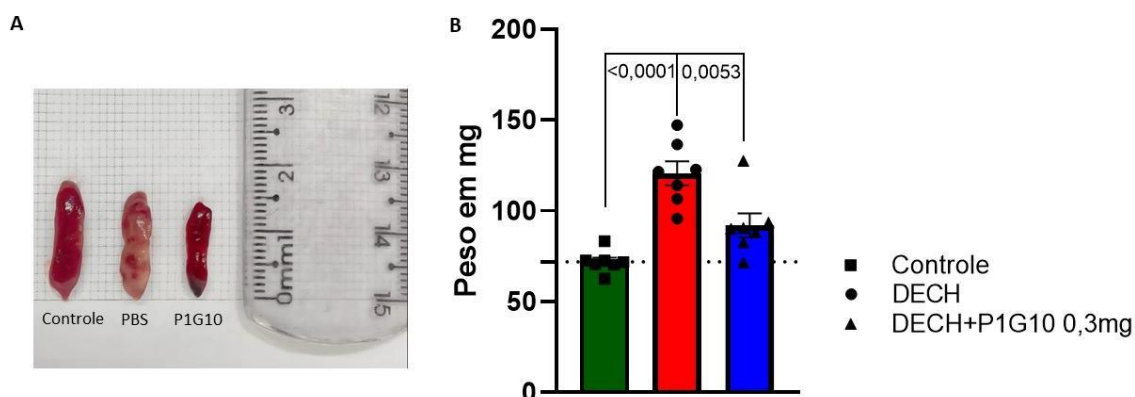
Na análise morfométrica do baço dos animais dos grupos controle, DECH+PBS e DECH+P1G10 0,3 mg/kg, observou-se que o tamanho do órgão não apresentou variação significativa entre os grupos avaliados (Fig. 23 A). No entanto, a análise do peso esplênico revelou diferenças significativas. Os baços dos animais do grupo DECH+PBS apresentaram peso significativamente maior quando comparados tanto ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ) quanto ao grupo tratado com P1G10 0,3 mg/kg (Fig. 23 B). Esses resultados indicam que a DECH induz um aumento do peso esplênico, possivelmente relacionado a um processo inflamatório ou hiperplasia reacional associada à doença. Por outro lado, o tratamento com a fração

proteolítica P1G10 foi capaz de atenuar este aumento, sugerindo um efeito modulador da fração sobre a resposta tecidual exacerbada promovida pela DECH.

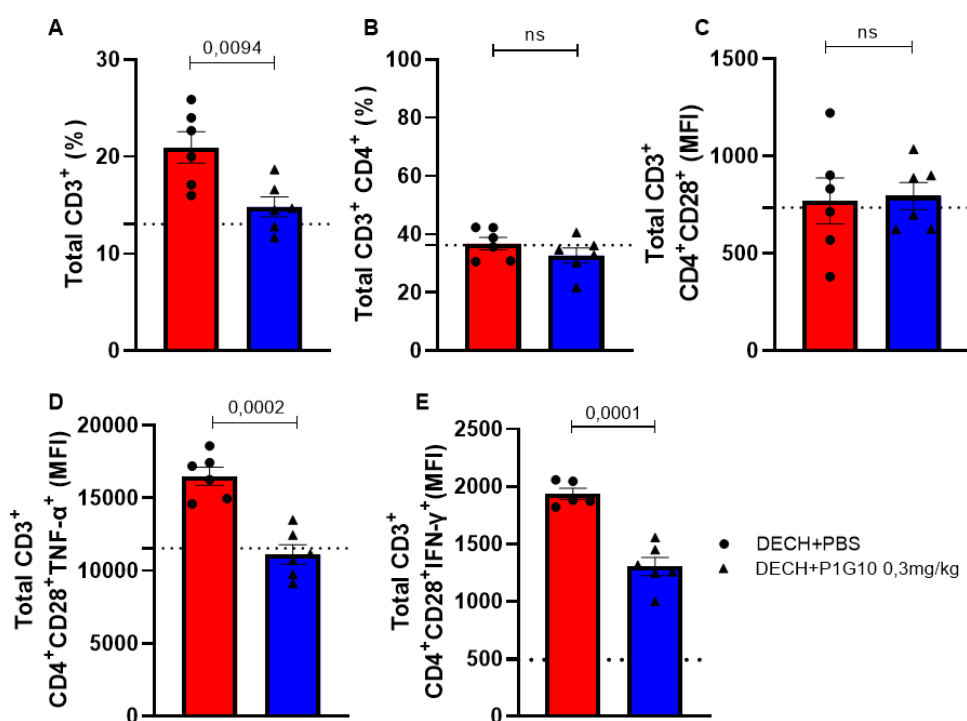
Para investigar os mecanismos celulares das células T relacionados produção e ativação das células imunológicas e dos mediadores inflamatórios (citocinas), foi realizada uma análise por citometria de fluxo no baço dos camundongos submetidos a DECH no décimo quinto dia após a indução, utilizando dois painéis de anticorpos (MIXs 1 e 2), conforme descrito na tabela 4 em material e métodos. No primeiro painel (MIX 1), foram avaliados marcadores de superfície associados aos linfócitos T auxiliares e citotóxicos- CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>, além da marcação intracelular para as citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , envolvidas de forma direta na fisiopatologia da DECH. No MIX 2, utilizou-se marcações específicas para células T reguladoras- T CD4<sup>+</sup>+CD25<sup>+</sup>+FoxP3<sup>+</sup>), complementadas pela marcação intracelular da citocina IL-10. As células T reguladoras desempenham um papel fundamental na atenuação da resposta inflamatória nos órgãos-alvo durante a fisiopatologia da DECH, pesquisas experimentais mostram que camundongos deficientes de células T CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> apresentam sinais clínicos mais acentuados da DECH, além de mortalidade mais precoce (WHANGBO et al., 2020; GUO et al., 2021).

Os resultados obtidos com o painel MIX 1 apresentaram uma redução na frequência de linfócitos T CD3<sup>+</sup> ( $p=0,0094$ ), na *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) CD4<sup>+</sup>+CD8<sup>+</sup> produtores de TNF- $\alpha$  ( $p=0,0002$ ) e produtores de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ) (Fig. 24 A-E) nos animais com DECH tratados com P1G10 (0,3mg/kg) quando comparados com os animais DECH que receberam veículo (PBS). Além disso, as células com perfil citotóxico tiveram uma redução na frequência de CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ), e MFI CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ), CD8<sup>+</sup> produtores de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Fig.25 A-E).

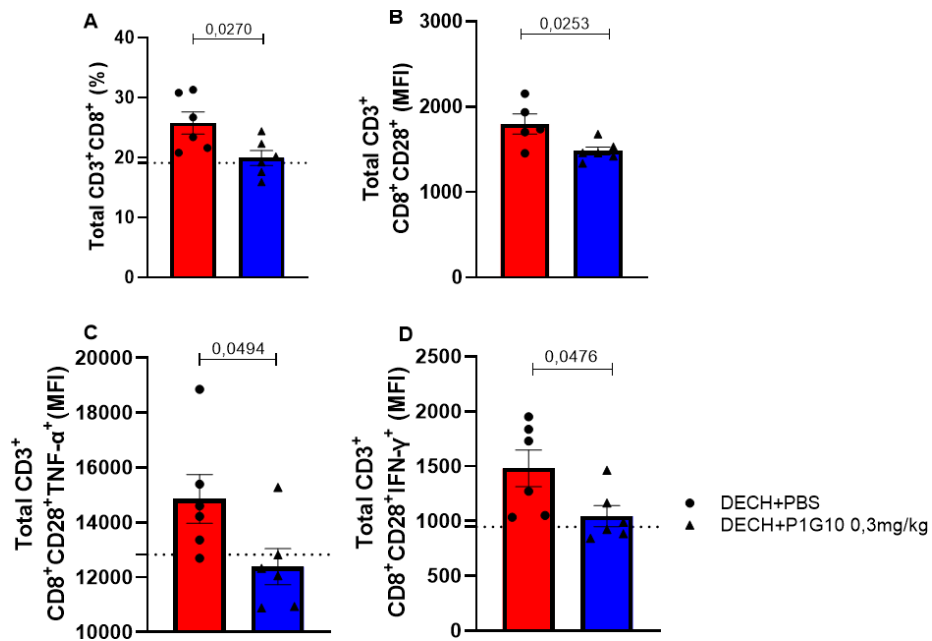
Com base na análise dos dados obtidos por citometria de fluxo para as células T reguladoras (MIX2), observou-se uma diferença estatisticamente significativa na expressão da molécula CD25<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ), avaliada por MFI, com aumento nos grupo tratado DECH+P1G10 0,3mg/kg quando comparado ao grupo DECH+PBS (Fig 26 B). Além disso, a produção de IL-10, também mensurada por MFI, apresentou maior produção, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com a fração (Fig. 26 E). Entretanto, não encontramos diferença significativa na frequência e na MFI das células que expressam FOXP3<sup>+</sup> nos grupos avaliados (Fig. 26 C, D).



**Figura 23. Morfometria do baço dos animais controle, DECH+PBS, DECH+P1G10.** (A) Imagem representativa dos grupos analisados (B) Peso dos baços dos grupos Controle, DECH+PBS e DECH+P1G10. Número de animais na morfometria do baço: controle n=5, DECH+PBS n=7, DECH+P1G10 n=7. Os dados apresentados correspondem à média e erro padrão da média. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por one-way-ANOVA.

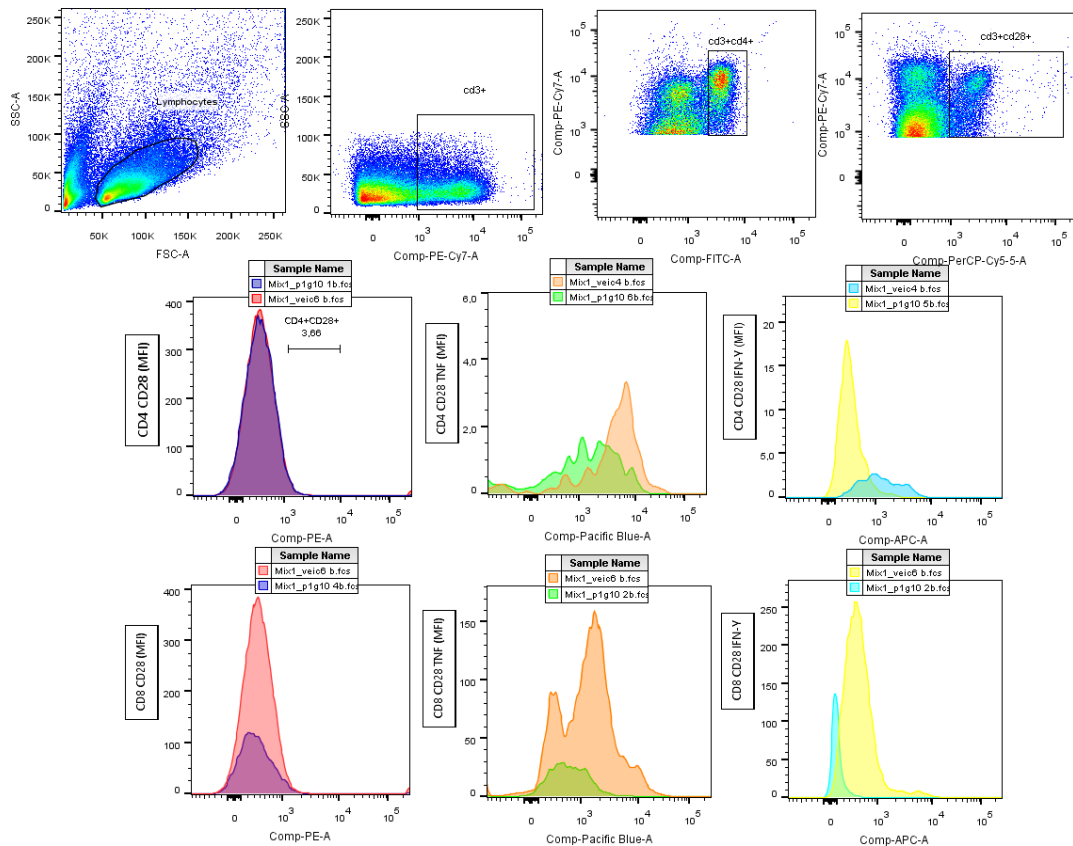


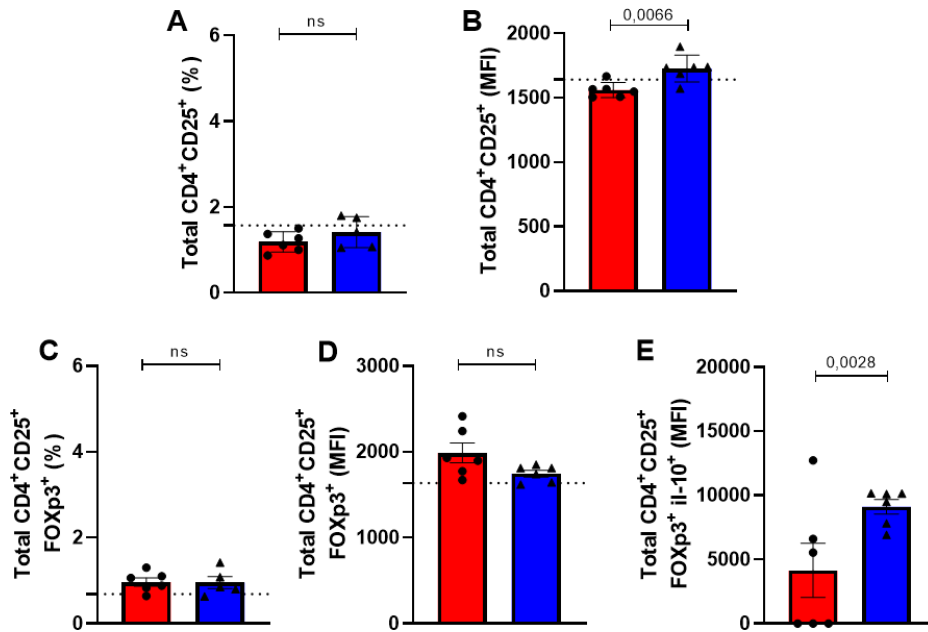
**Figura 24. Tratamento com P1G10 alterou a frequência e MFI de células T auxiliares no baço de animais com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T CD4+ no baço. (A) Frequência de CD3+ (B) Frequência de CD4+ (C) MFI de CD4+CD28+ (D) MFI de CD4+CD28+ produtor de TNF- $\alpha$  (E) MFI de CD4+CD28+ produtor de IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=6, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=6. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.



**Figura 25. Tratamento com P1G10 alterou a frequência e MFI de células T citotóxicas no baço de animais com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T CD8<sup>+</sup> no baço. (A) Frequência de CD8<sup>+</sup> (B) MFI de CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> (C) MFI de CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> produtor de TNF- $\alpha$  (D) MFI de CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=6, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=6. Os dados apresentados correspondem à média e erro padrão da média. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

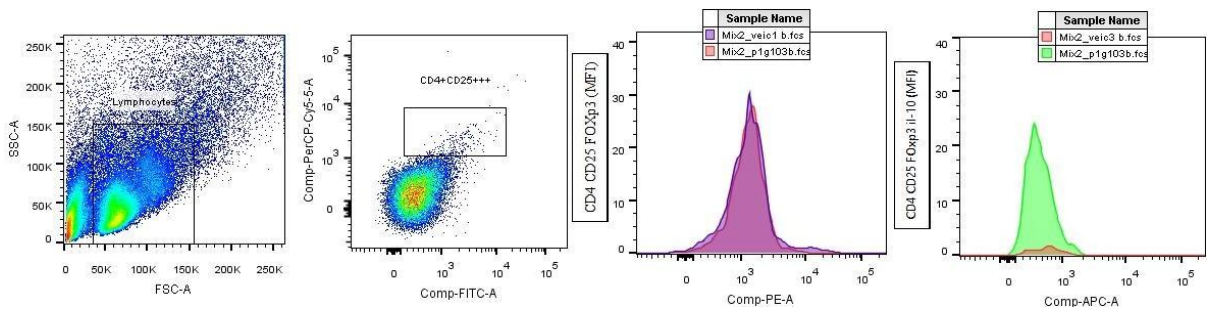
### GATE CÉLULAS T auxiliares e citotóxicas ativas e produtoras de citocinas





**Figura 26. Tratamento com P1G10 alterou a MFI da células T reguladoras CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> no baço de animais com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T reg no baço. (A) Frequência de C25<sup>+</sup> (B) MFI de CD25<sup>+</sup> (C) Frequência de CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (D) MFI de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (E) MFI de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> produtor de IL-10. Número de animais na citometria de fluxo: controle n=6, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=6. Os resultados são apresentados como média ± SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

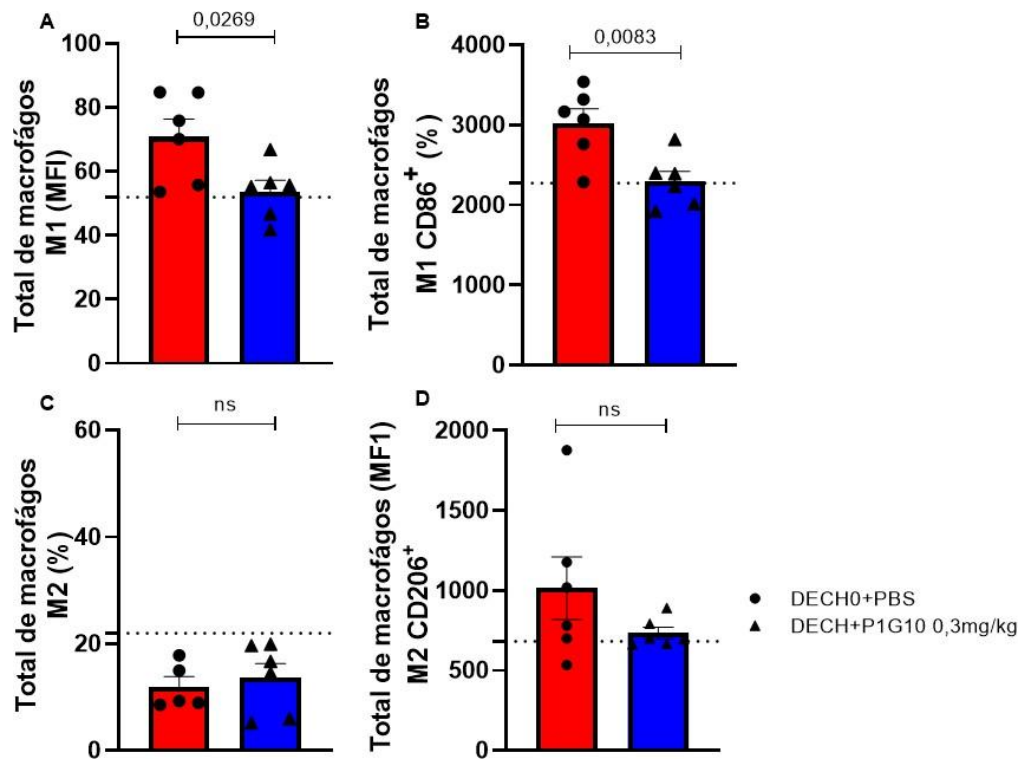
### GATE Células T reguladoras CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> produtora de IL-10.



## 5.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO BAÇO DE CAMUNDONGOS COM DECH

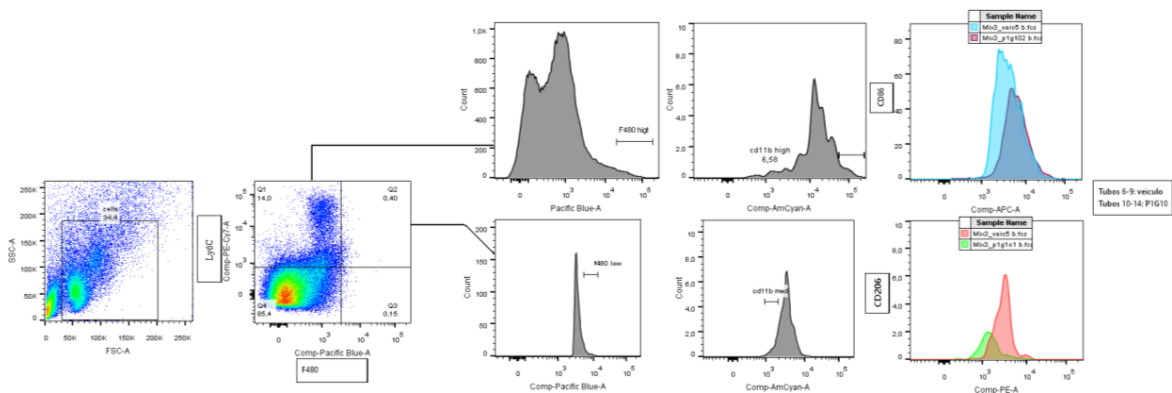
No baço, os macrófagos são essenciais na resposta imune, atuando na remoção de células apoptóticas, apresentação de antígenos e modulação da inflamação. Além disso, o baço é um importante ativador da resposta imune, servindo como local de diferenciação e ativação de células imunológicas, incluindo macrófagos, que influenciam diretamente a progressão da DECH (XU, 2025). O painel MIX3 (marcadores F4/80, CD11b, Ly6C, CD86<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>) permite uma análise detalhada da função e modulação dos macrófagos esplênicos, fornecendo informações sobre sua produção e ativação.

Os resultados revelaram diminuição na frequência de macrófagos M1 ( $p < 0,05$ ), assim como nos níveis de MFI  $CD86^+$  ( $p < 0,05$ ) nos camundongos DECH+P1G10 (0,3mg/kg) quando comparado aos animais DECH+PBS (Fig. 27 A-B). em animais tratados com P1G10. Por outro lado, os resultados revelaram diminuição ao aumento na frequência de macrófagos M2 e na ativação por MFI  $CD206^+$  (Fig. 27 C-D).



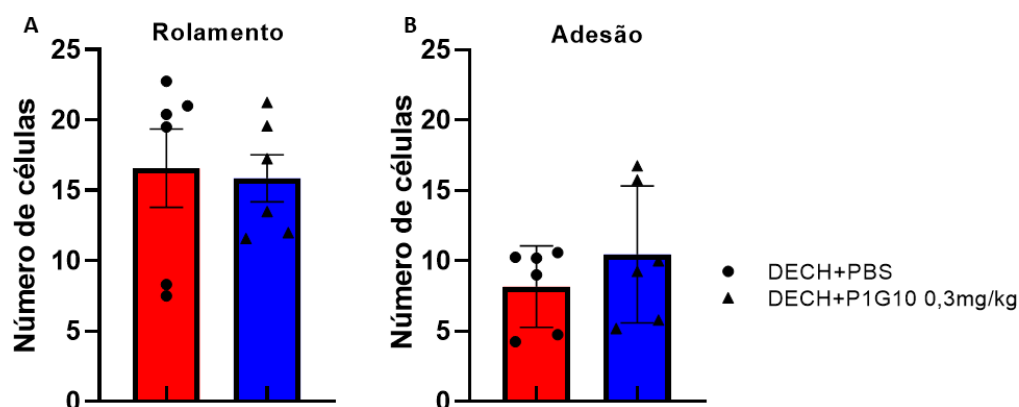
**Figura 27. A P1G10 diminuiu a frequência de macrófagos M1 e a ativação em MFI  $CD86^+$  no baço de camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular de macrófagos no baço. (A) Frequência de  $M1^+$  (B) MFI  $M1^+CD86^+$  (C) Frequência de  $M2^+$  (D) MFI  $M2^+CD206^+$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=6, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=6. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

#### GATE para macrófagos $M1 CD86^+$ (PRÓ-INFMATÓRIO) e $M2 CD206^+$ (ANTI-INFLAMATÓRIO)



## 5.6. EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 SOBRE O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PARA O INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM DECH

Com o objetivo de avaliar se a fração proteolítica P1G10 influencia o rolamento leucocitário e/ou a adesão de leucócitos nos vasos mesentéricos intestinais, foi utilizada a técnica de microscopia intravital utilizando células GFP+ transplantadas, conforme descrito na metodologia. Os resultados encontrados mostraram que a administração de P1G10, na dose de 0,3 mg/kg, não exerceu impacto significativo sobre a migração celular. Portanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com P1G10 e o grupo de veículo (PBS) em relação aos parâmetros de rolamento e adesão leucocitária. Esses achados indicam que, na dose avaliada, o P1G10 não altera de forma relevante os mecanismos de interação celular nos vasos mesentéricos durante o processo inflamatório da DECH.



**Figura 28. A P1G10 não interfere nos parâmetros de rolamento e adesão leucocitário.** Avaliação do recrutamento celular de células nos vasos mesentéricos intestinais. (A) Rolamento de células por minuto nos vasos mesentéricos intestinais. (B) Adesão de células em vaso mesentérico intestinal de 100  $\mu$ m de comprimento. Os dados apresentados correspondem à média e erro padrão da média. Número de animais avaliados: DECH+PBS n=06, DECH+P1G10 n=06.

## 5.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T DO INTESTINO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CAMUNDONGOS COM DECH

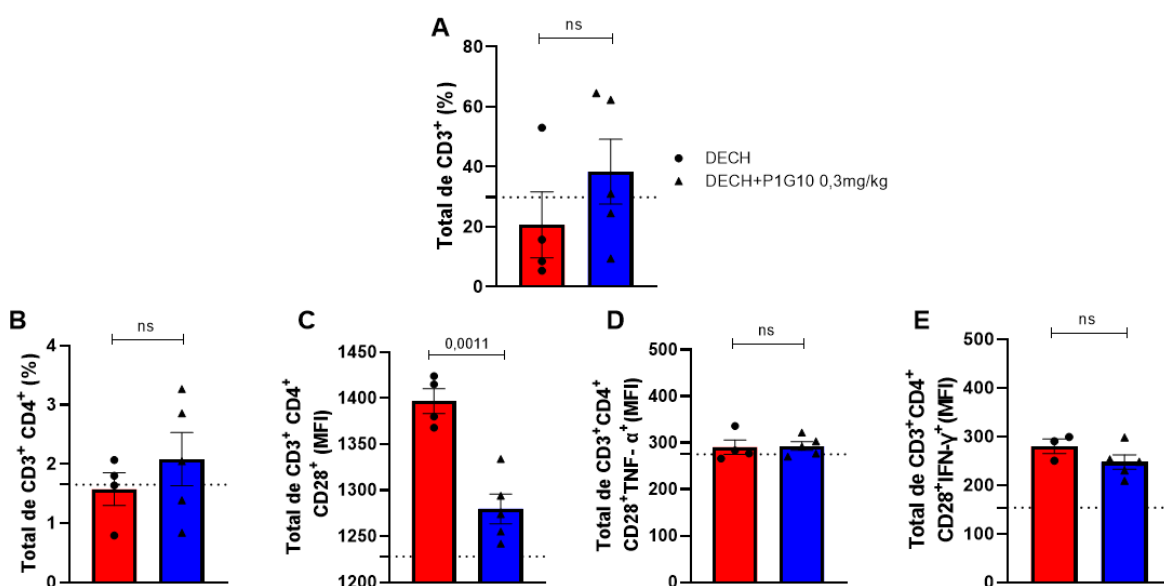
No décimo quinto dia após a indução da doença foi realizada a análise do perfil dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos do intestino dos animais com DECH submetidos ao tratamento com P1G10 e os animais que receberam apenas PBS com o intuito de avaliar se houve diferença entre as células imunes recrutadas para o órgão-alvo dos diferentes grupos.

Empregando um painel único de marcação (MIX1), investigamos a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em subpopulações distintas de linfócitos T CD4+ e CD8+. Nossos resultados revelaram uma diminuição notável na frequência de linfócitos T auxiliares ativados CD3+CD4+CD28+ ( $p < 0,05$ ) (Fig. 29 C). Adicionalmente, observamos uma redução significativa na intensidade média de fluorescência (MFI) de células T citotóxicas ativadas

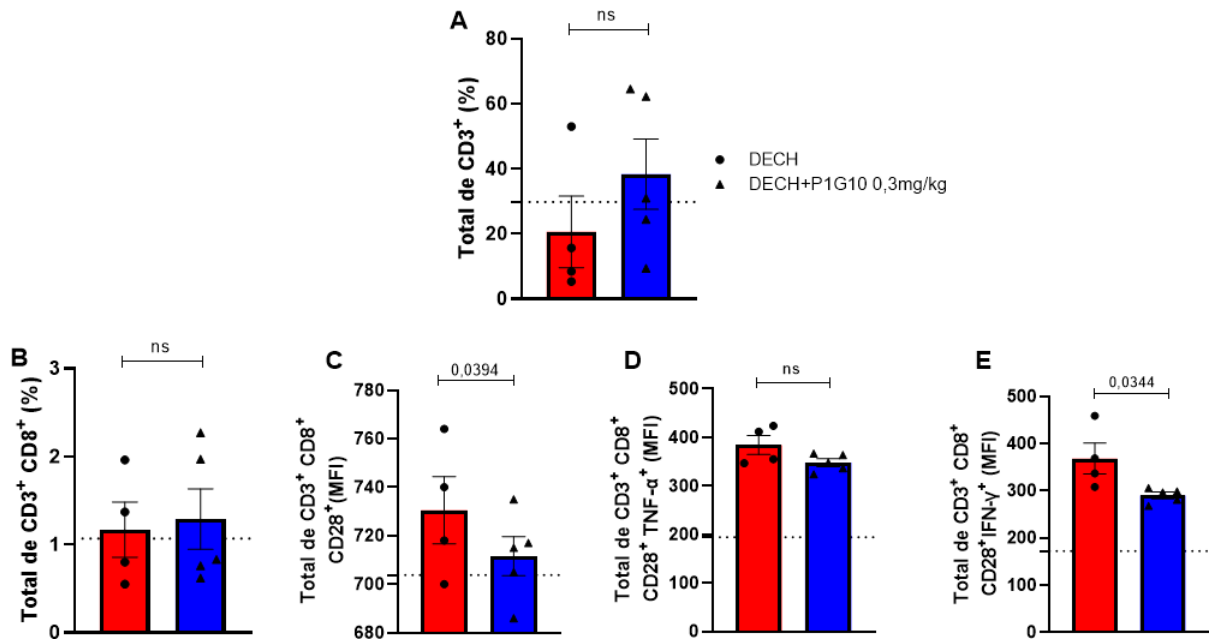
CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (p < 0,05), bem como uma diminuição na quantidade dessas mesmas células ativadas produtoras de IFN- $\gamma$  (Fig. 30 C e E) nos animais com DECH tratados com P1G10 0,3mg/kg, em comparação com o grupo DECH+PBS.

No segundo painel de anticorpos (MIX 2), o foco da investigação foi nas células T reguladoras, conhecidas como T reg. Para essa análise, foram utilizados marcadores extracelulares para T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, complementados pela marcação intracelular da citocina IL-10, mesma forma de análise utilizada no baço. O objetivo foi de identificar e quantificar subpopulações reguladoras com potencial para modulação da resposta inflamatória para um perfil mais anti-inflamatório.

Nos resultados obtidos encontramos um aumento na frequência do marcador CD25<sup>+</sup> (p < 0,05) (Fig. 31 A) nos animais tratados com P1G10 (0,3mg/kg), assim como aumento do mesmo marcador por MFI (p < 0,001) (Fig. 31 B) quando comparados com os animais DECH+PBS. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos marcadores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> em células T reg do jejuno-íleo (Fig. 31 C, D e E).

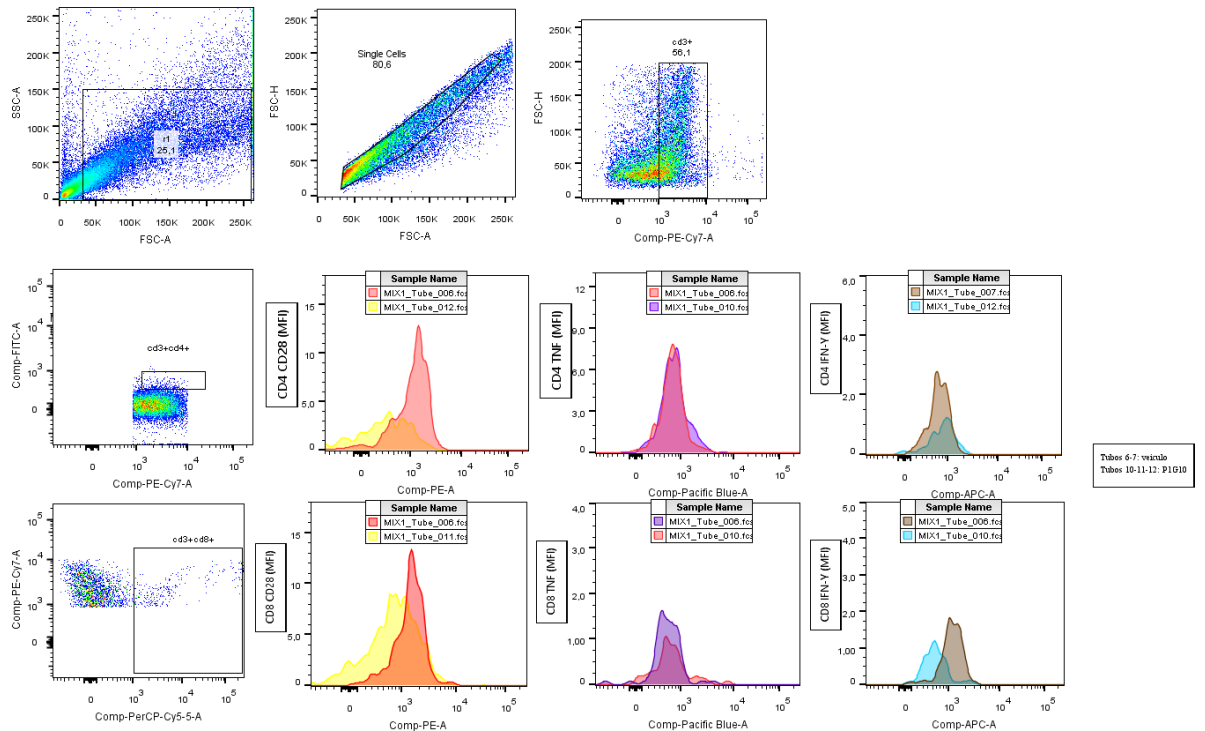


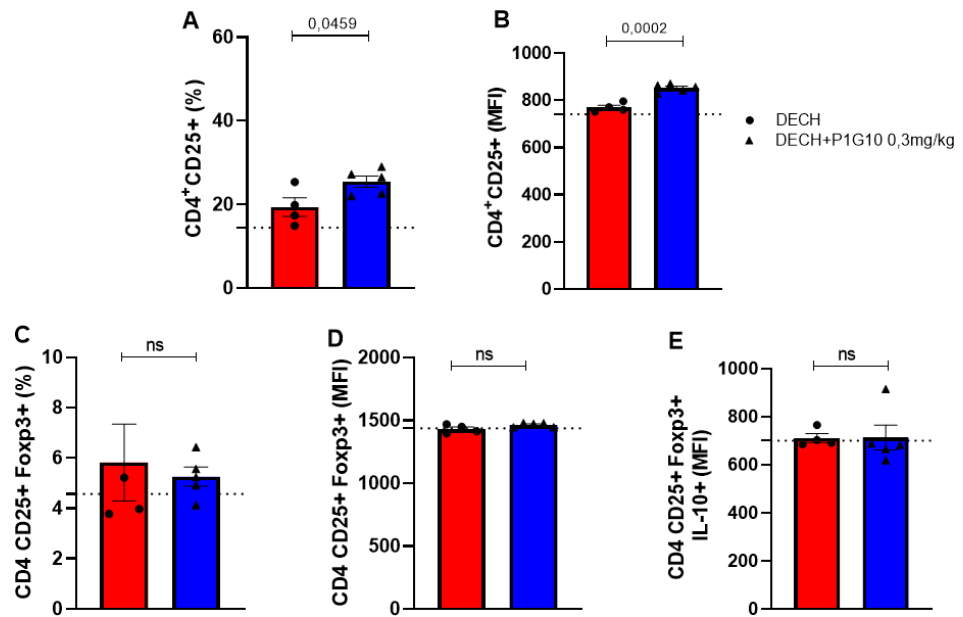
**Figura 29. A P1G10 diminuiu a ativação das células TCD4<sup>+</sup> no jejuno-íleo dos camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular das células T CD4<sup>+</sup> no jejuno-íleo. (A) Frequência de CD3<sup>+</sup> (B) Frequência de CD4<sup>+</sup> (C) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (D) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor TNF- $\alpha$  (E) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=5, DECH+PBS n=4, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e p < 0.05 por test T student.



**Figura 30.** A P1G10 diminuiu a ativação das células TCD8<sup>+</sup> e quantidade de IFN- $\gamma$  no jejuono-íleo dos camundongos com DECH. Avaliação do perfil celular dos células T CD8<sup>+</sup> no jejuono-íleo. (A) Frequência de CD3<sup>+</sup> (B) Frequência de CD8<sup>+</sup> (C) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. (D) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor TNF- $\alpha$  (E) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor de IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=5, DECH+PBS n=4, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

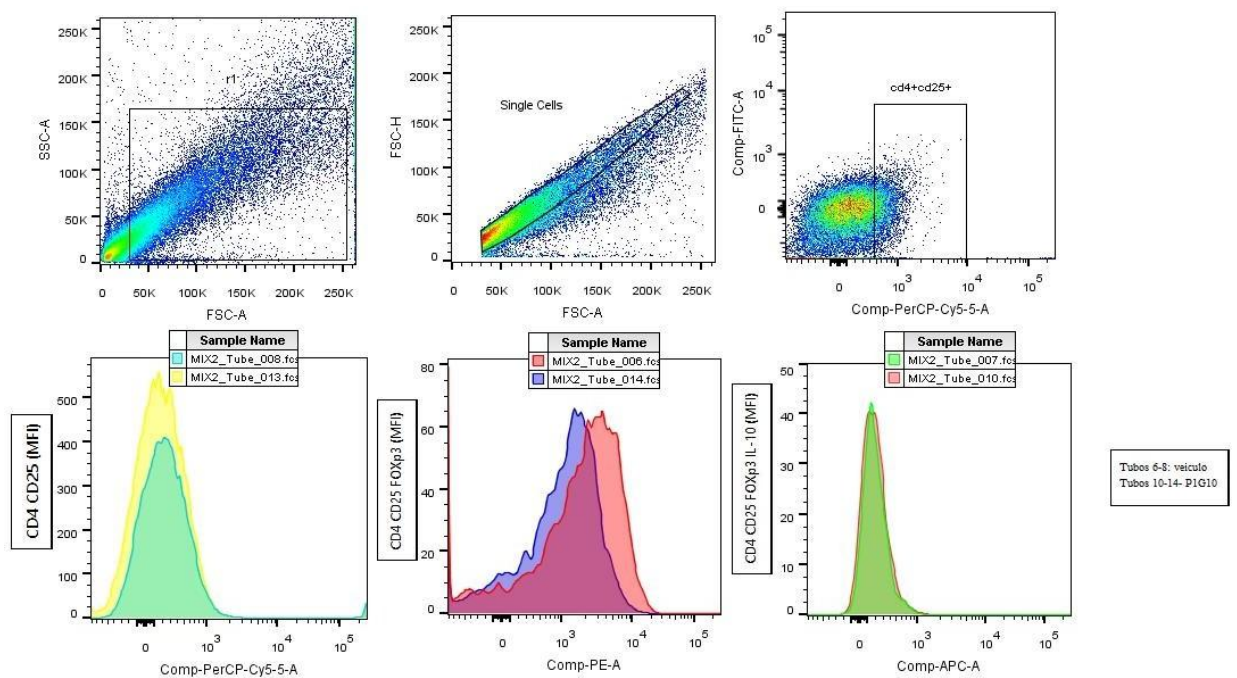
### GATE CÉLULAS T auxiliares e citotóxicas ativas e produtoras de citocinas





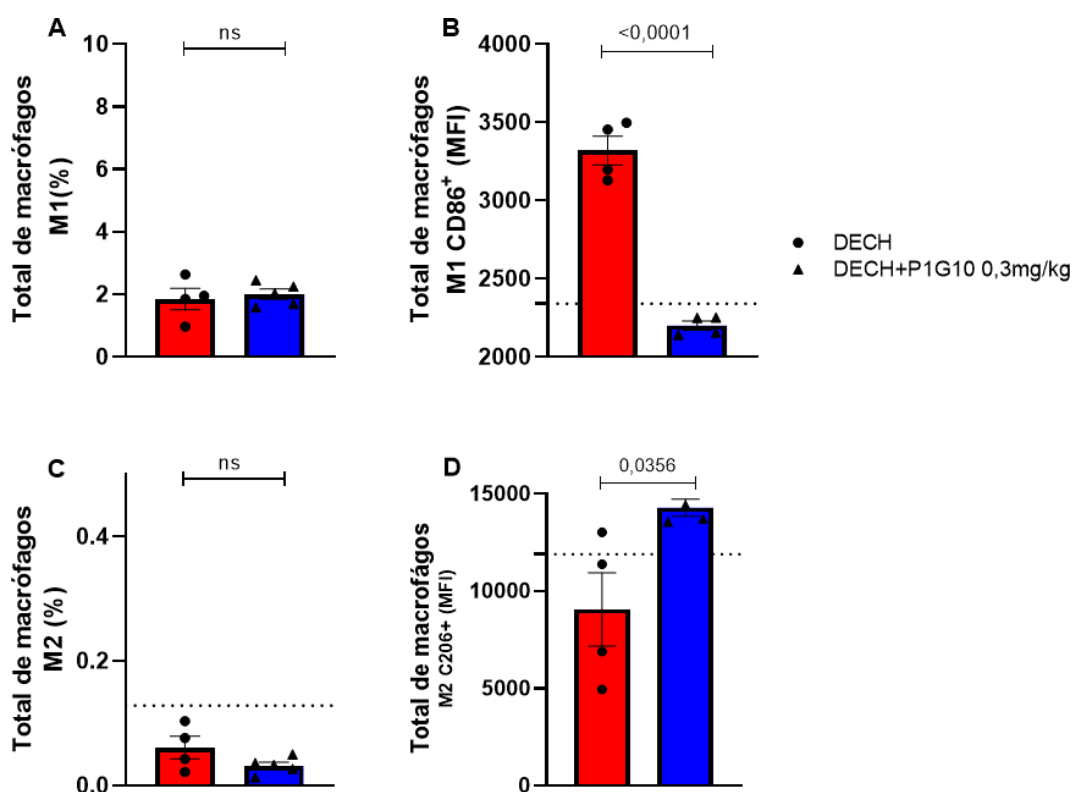
**Figura 31. A P1G10 aumentou a ativação de células T CD25<sup>+</sup> reguladoras no jejuno-íleo de camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T reg no jejuno-íleo. (A) Frequência de CD25<sup>+</sup> (B) MFI de CD25<sup>+</sup> (C) Frequência de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (D) MFI de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (E) MFI de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> produtora de IL-10. Número de animais na citometria de fluxo: CONTROLE n=5, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

### GATE Células T reguladoras CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> produtora de IL-10



## 5.8. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO INTESTINO POR CITOMETRIA DE FLUXO

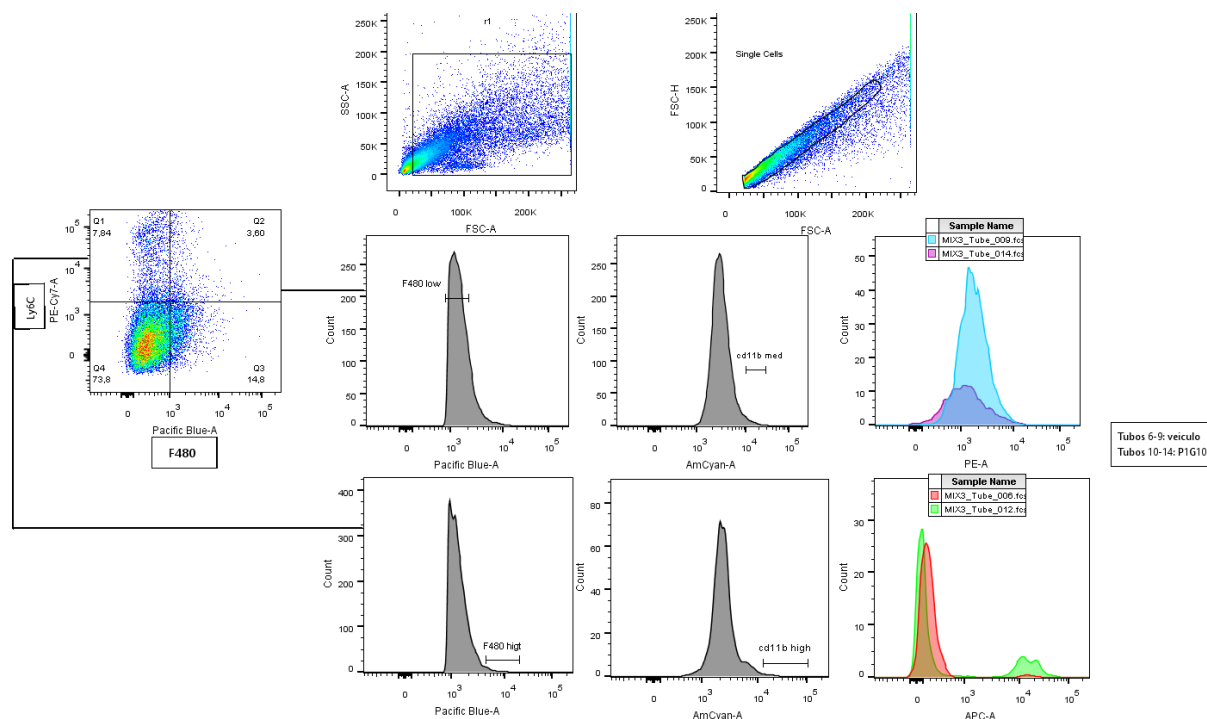
No contexto DECH, os macrófagos intestinais desempenham um papel crucial na regulação da inflamação, reparo tecidual e resposta imune. Sua polarização (pró-inflamatória M1/CD86<sup>+</sup> ou anti-inflamatória M2/CD206<sup>+</sup>) influencia diretamente a progressão da doença (XU et al., 2025). Com base em evidências prévias de que a fração proteolítica P1G10 modula os níveis de macrófagos em outros modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, realizamos uma análise específica no tecido intestinal por citometria de fluxo, utilizando o painel MIX3 (F4/80, CD11b, Ly6C, CD86<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>). Os resultados revelaram que o tratamento com P1G10 induziu uma modulação significativa no perfil dos macrófagos intestinais no modelo de DECH. Os animais do grupo DECH+P1G10 apresentaram redução marcante na ativação de macrófagos pró-inflamatórios M1 (CD86<sup>+</sup>) ( $p < 0,0001$ ; Fig. 32 B), aumento na frequência de macrófagos anti-inflamatórios M2 (CD206<sup>+</sup>) ( $p < 0,05$ ; Fig. 32 D) no jejuno-íleo, em comparação ao grupo controle (DECH+PBS). Entretanto, a frequência basal de macrófagos M1 e M2 (Fig. 32 A e C) não diferiu entre os grupos, sugerindo que a P1G10 atua principalmente na modulação funcional (ativação/ polarização) dessas células, e não em sua frequência total.



**Figura 32. A P1G10 diminuiu a ativação de M1 CD86<sup>+</sup> e aumentou MFI M2 CD206<sup>+</sup> no jejuno-íleo de camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular de macrófagos no jejuno-íleo. (A) Frequência de M1<sup>+</sup> (B) MFI M1<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (C) Frequência de M2<sup>+</sup> (D) MFI de M2<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>. Número de animais na citometria de fluxo:

CONTROLE n=5, DECH+PBS n=4, DECH+PIG10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

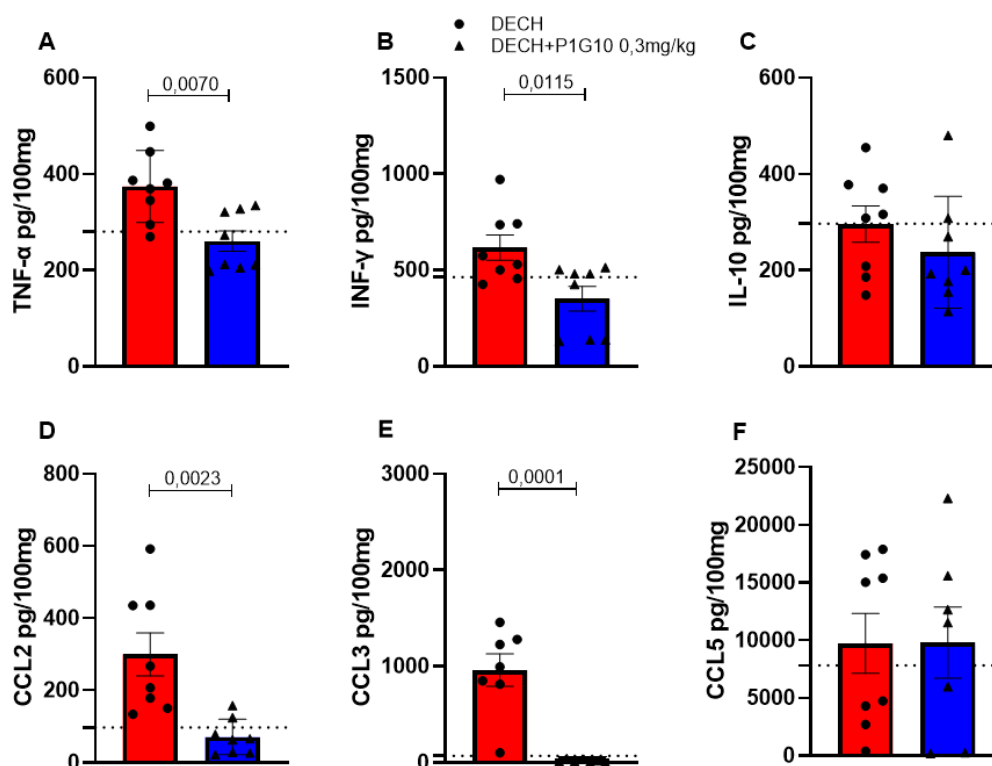
### GATE para macrófagos M1 CD86+ (PRÓ-INFMATÓRIO) e M2 CD206+ (ANTI-INFLAMATÓRIO)



## 5.9. EFEITO DA P1G10 NOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO JEJUNO-ÍLEO DE CAMUNDONGOS COM DECH

Com base em evidências prévias que demonstram a capacidade do P1G10 em reduzir a concentração de citocinas em modelos experimentais (colite, queimaduras e tumores), avaliamos os níveis de mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento celular para órgãos-alvo, com foco no intestino. Foram quantificadas as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 e das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 na região do jejuno-íleo, utilizando amostras coletadas no 15º dia pós-indução da DECH.

Os animais tratados com a dose de escolha P1G10 a 0,3mg/kg apresentaram redução nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 33. A e B) quando comparados aos animais que receberam DECH+PBS. Entretanto, não houve aumento ou redução dos níveis da citocina IL-10 (Fig. 33 C), caracterizada por perfil anti-inflamatório. De igual modo, houve redução nos níveis da quimiocina CCL2 ( $p < 0,05$ ) e CCL3 ( $p=0,0001$ ) (Fig. 33 D e E), quimiocinas pró-inflamatórias, que possuem como papel central o recrutamento de manócitos-macrófagos da corrente sanguínea para tecidos inflamados. A quimiocina CCL5 (Fig. 33 F) não apresentou alteração significativa entre os grupos.

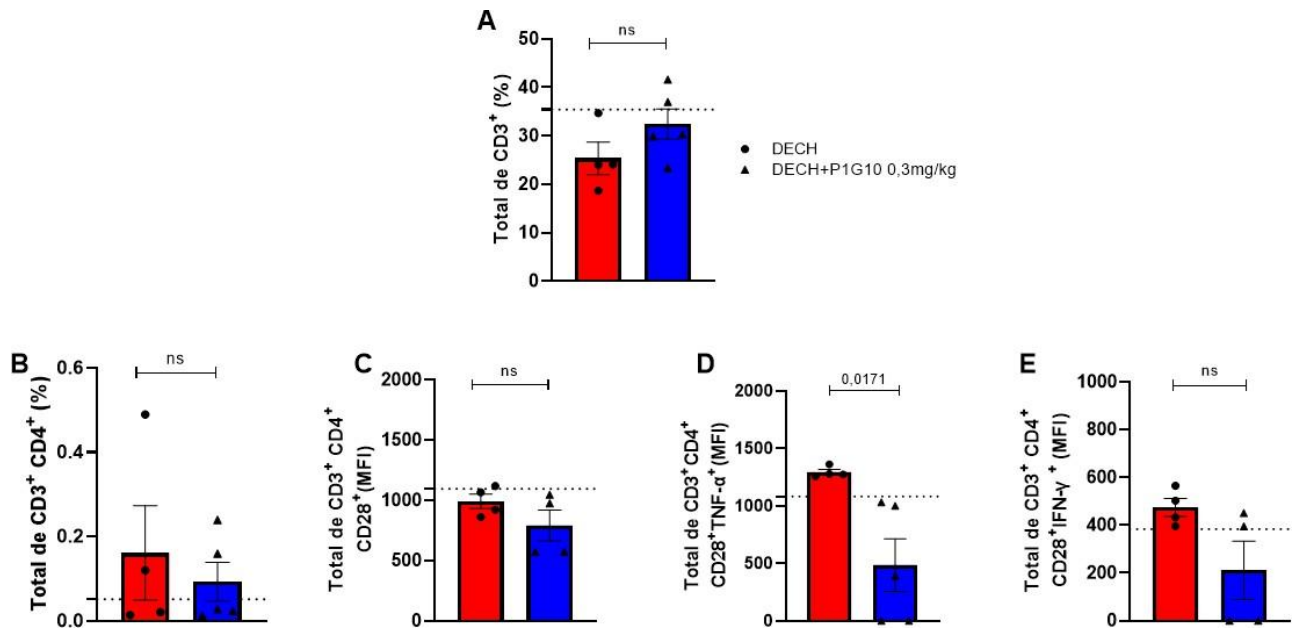


**Figura 33. A P1G10 diminuiu a concentração de citocinas e quimiocinas no intestino de camundongos com DECH.** Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 por meio do ensaio de ELISA. (A) Quantidade de TNF- $\alpha$  em pg/100 mg no jejuno-íleo. (B) Quantidade de IFN- $\gamma$  em pg/100 mg no jejuno-íleo. (C) Quantidade de IL-10 em pg/100 mg jejuno-íleo. (D) Quantidade de CCL2 em pg/100 mg no jejuno-íleo. (E) Quantidade de CCL3 em pg/100 mg no jejuno-íleo. (F) Quantidade de CCL5 em pg/100 mg no jejuno-íleo. Número de animais avaliados quanto às citocinas e quimiocinas: controle n=06, DECH+PBS n=08 DECH+P1G10 n=8. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

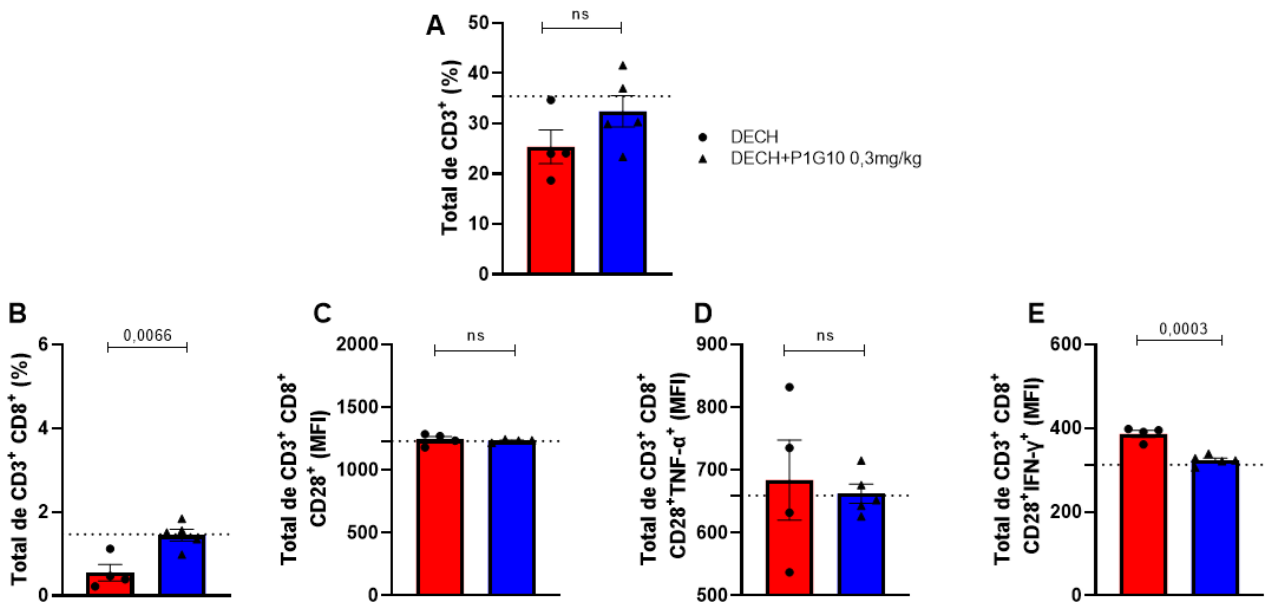
## 5.10. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM DECH POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a dinâmica da resposta imunológica nos órgãos-alvo, estendemos a análise realizada no baço e intestino, no 15º dia pós-indução da DECH, ao fígado dos camundongos com o objetivo de avaliar os padrões de recrutamento, ativação e a produção local de citocinas.

Os resultados mostraram uma redução significativa na MFI de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com P1G10 (0,3 mg/kg), quando comparados ao grupo DECH+PBS (Fig. 34 D e E). Os animais tratados com P1G10 apresentaram, ainda, aumento de MFI na frequência de células CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) e de células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ) (Fig. 35 C e D), quando comparados aos animais com DECH que receberam apenas veículo. Em relação as marcações para linfócitos T reg, observou-se aumento na frequência e MFI das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do grupo DECH+P1G10 0,3mg/kg quando comparado ao grupo DECH+PBS (Fig. 36 D).

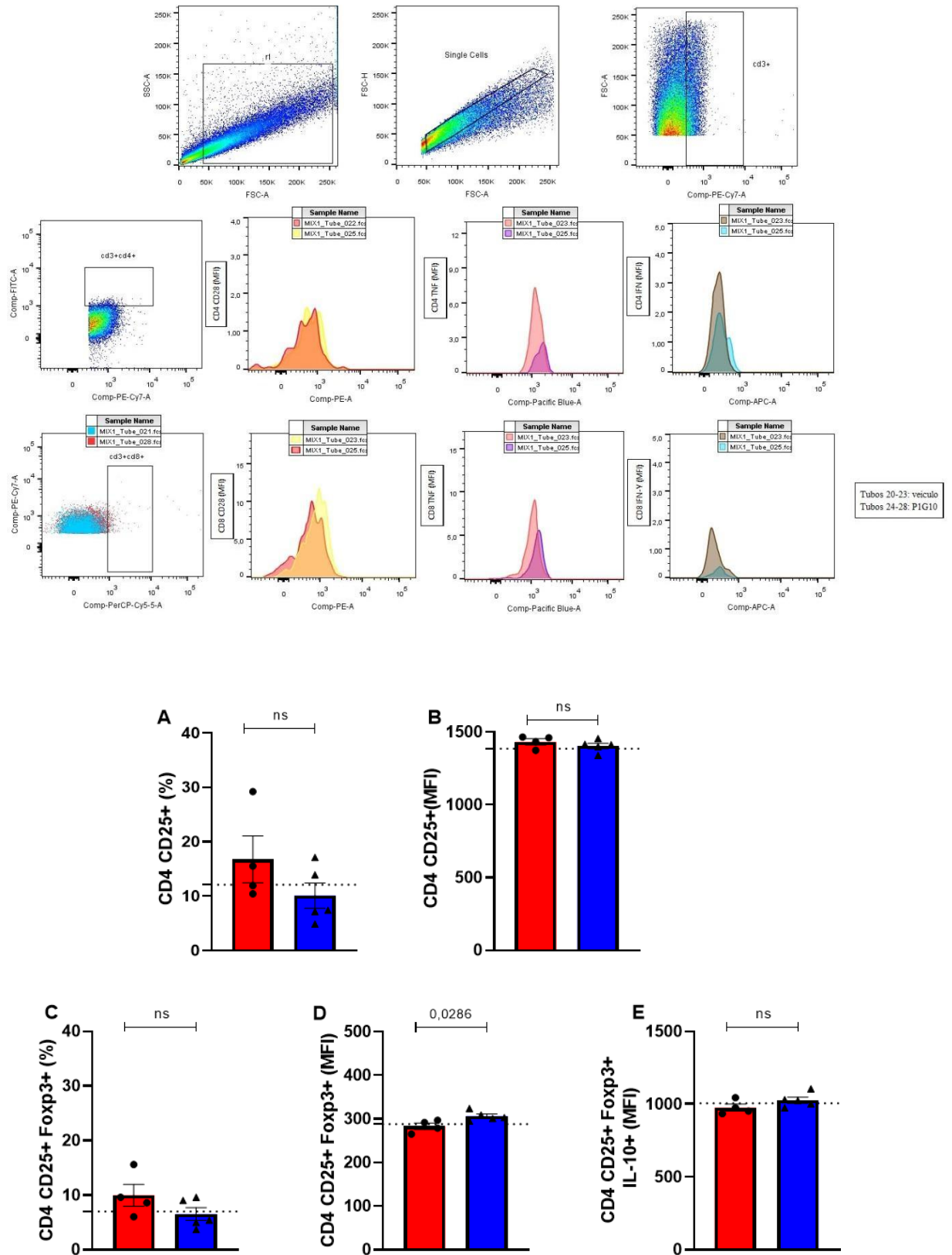


**Figura 34. A P1G10 alterou significadamente a quantidade de TNF- $\alpha$  no fígado de animais com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T CD4<sup>+</sup> no fígado. (A) Frequência de CD3<sup>+</sup> (B) Frequência de CD4<sup>+</sup> (C) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. (D) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor TNF- $\alpha$  (E) MFI de CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor de IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=5, DECH+PBS n=4, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.



**Figura 35. A P1G10 alterou a frequência de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> e quantidade de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  no fígado de camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular dos células T CD8<sup>+</sup> no fígado. (A) Frequência de CD3<sup>+</sup> (B) Frequência de CD8<sup>+</sup> (C) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (D) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor TNF- $\alpha$  (E) MFI de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtor de IFN- $\gamma$ . Número de animais na citometria de fluxo: controle n=5, DECH+PBS n=4, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

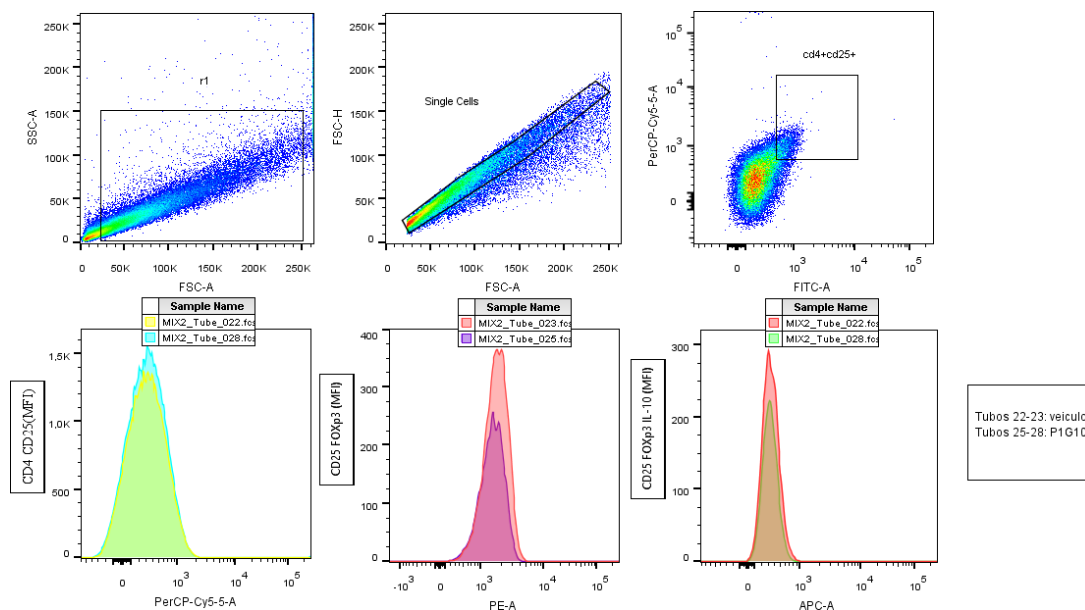
### GATE CÉLULAS T auxiliares e citotóxicas ativas e produtoras de citocinas



**Figura 36.** A P1G10 aumentou os níveis de frequência e MFI das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras no fígado de animais com DECH. Avaliação do perfil celular dos células T reg no fígado. (A) Frequência de CD25<sup>+</sup> (B) MFI de CD25<sup>+</sup> (C) Frequência de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (D). MFI de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (E). MFI de

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> produtora de IL-10. Número de animais na citometria de fluxo: controle n=5, DECH+PBS n=5, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

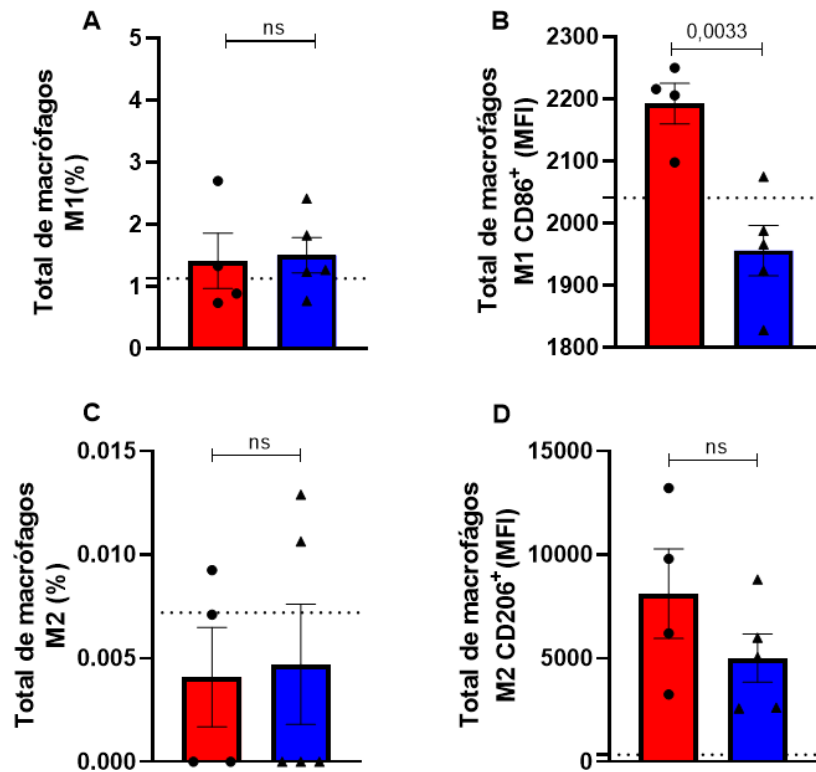
### **GATE Células T reguladoras CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> produtora de IL-10**



## 5.11. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM DECH POR CITOMETRIA DE FLUXO

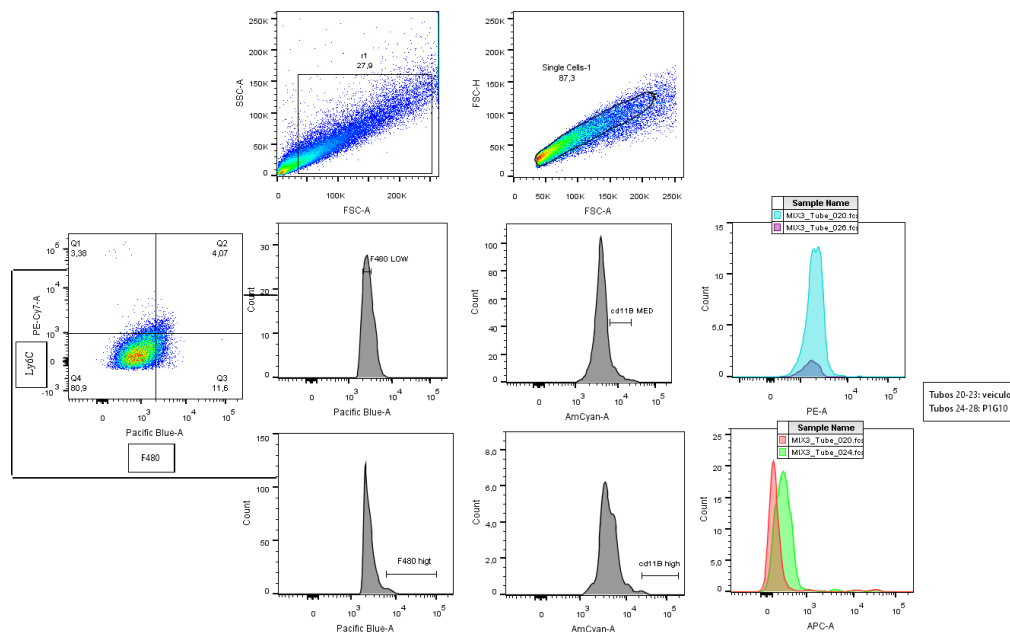
No fígado, os macrófagos residentes, conhecidos como células de Kupffer, localizam-se nos sinusoides hepáticos e desempenham funções essenciais, como a fagocitose de bactérias e a remoção de hemácias envelhecidas (KOLIOS et al., 2006; DOU et al., 2020). Na DECH, essas células têm um papel central na ativação da resposta imune, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e IL-6) e recrutando outras células inflamatórias, o que amplifica a lesão tecidual. Além disso, a ativação excessiva das células de Kupffer pode contribuir para a disfunção hepática (ZEISER; TESHIMA, 2021).

Os resultados indicaram diminuição de macrófagos M1 CD86<sup>+</sup> por MF1 nos animais DECH+P1G10 (0,3 mg/kg) ( $p < 0,05$ ) em comparação com os animais DECH+PBS (Fig 37 B). Não foram encontradas mudanças significativas para a frequência de macrófagos M1 e M2, e MFI para M2 CD206<sup>+</sup> (Fig. 37 A, C e D).



**Figura 37. A P1G10 diminuiu a ativação MFI M1CD86+ no fígado de camundongos com DECH.** Avaliação do perfil celular de macrófagos no fígado. (A) Frequência de M1 (B) MFI de M1<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (C) Frequência de M2 (D) MFI de M2<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>. Número de animais na citometria de fluxo: CONTROLE n=5, DECH+PBS n=6, DECH+P1G10 n=6. Os resultados são apresentados como média ± SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

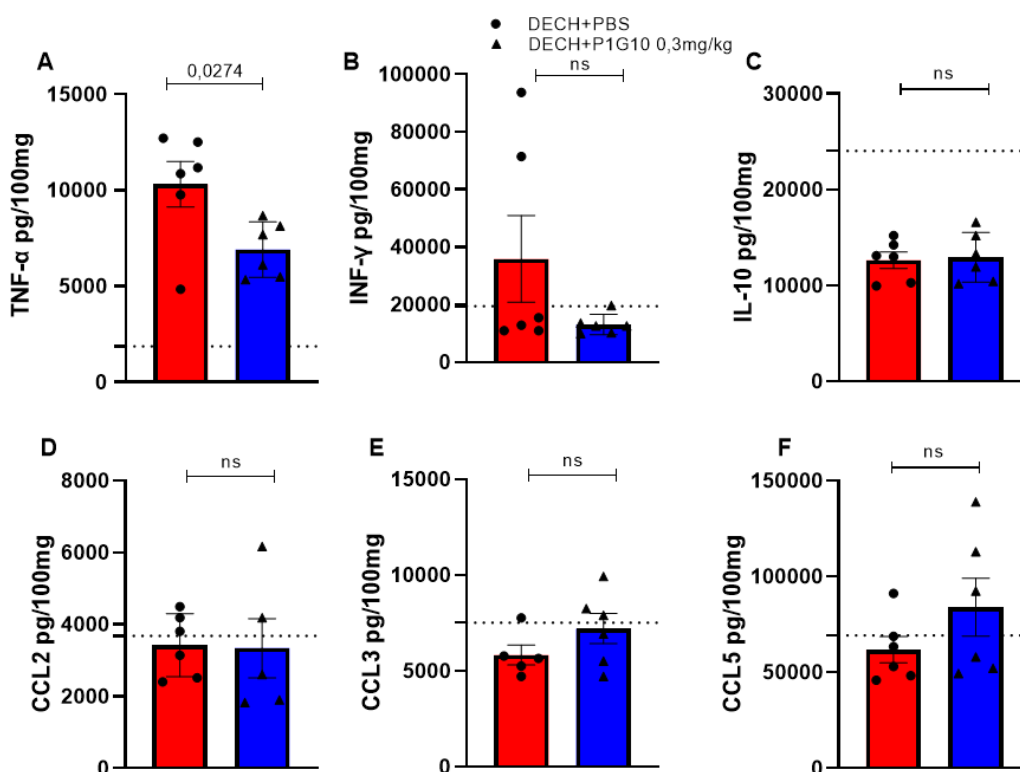
**GATE para macrófagos M1 CD86+ (PRÓ-INFLAMATÓRIO) e M2 CD206+ (ANTI-INFLAMATÓRIO)**



## 5.12. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO FÍGADO DE ANIMAIS COM DECH.

Com base em evidências prévias que demonstram a capacidade do P1G10 em reduzir a concentração de citocinas em modelos experimentais (colite, queimaduras e tumores), avaliamos os níveis de mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento celular para órgãos-alvo, agora no fígado. Foram quantificadas as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 e das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 no órgão utilizando amostras coletadas no 15º dia pós-indução da DECH.

De maneira similar ao jejuno-íleo houve redução nos níveis da citocina TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 38 A). Todavia, as demais citoninas IFN- $\gamma$ , IL-10 (Fig. 38 B e C), não apresentaram alterações significativas. Os níveis de quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 (Fig. 38 D, E e F), não apresentaram redução ou aumento significativo.



**Figura 38. A P1G10 diminuiu a concentração TNF- $\alpha$  no fígado de camundongos com DECH.** Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 por meio do ensaio de ELISA. (A) Quantidade de TNF- $\alpha$  em pg/100 mg no fígado. (B) Quantidade de IFN- $\gamma$  em pg/100 mg no fígado. (C) Quantidade de IL-10 em pg/100 mg fígado. (D) Quantidade de CCL2 em pg/100 mg no fígado. (E) Quantidade de CCL3 em pg/100 mg no fígado. (F) Quantidade de CCL5 em pg/100 mg no fígado. Número de animais avaliados quanto às citocinas e quimiocinas: controle n=06, DECH+PBS n=06, DECH+P1G10 n=6. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0,05$  por test T student.

### 5.13. EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 SOBRE A LESÃO INTESTINAL E HEPÁTICA DE CAMUNDONGOS COM DECH

A DECH provoca danos estruturais significativos nos órgãos-alvo. Para avaliar essas lesões, realizamos uma análise histológica por meio da técnica de hematoxilina-eosina (HE), que permitiu identificar e quantificar as alterações morfológicas decorrentes da doença no intestino e fígado dos camundongos. As alterações histopatológicas foram sistematicamente pontuadas com base nos critérios estabelecidos nas Tabelas 5 e 6- descritas em materiais e métodos, demonstrando claramente o impacto da DECH na arquitetura tecidual desses órgãos.

Os resultados da análise histológica com os tecidos corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos veículo (DECH+PBS) e tratados com P1G10 (0,3 mg/kg), no jejuno-íleo, cólon e fígado (Figs. 39 A-C). No grupo controle, submetido ao transplante de células tronco-hematopoiéticas singênico, não foram identificados danos teciduais progressivos nos órgãos-alvo (Fig. 39 A-C). Entretanto, diferenças significativas foram identificadas nas porções intestinais avaliadas e no fígado ao comparar os grupos controle x DECH+PBS e Controle x DECH+P1G10 0,3 mg/kg (Fig. 39 A-C). Esses achados evidenciam que, apesar da ausência de progressão tecidual no grupo controle, as lesões características da DECH estão presentes e bem definidas nos órgãos-alvo avaliados, reforçando a relevância do modelo experimental.

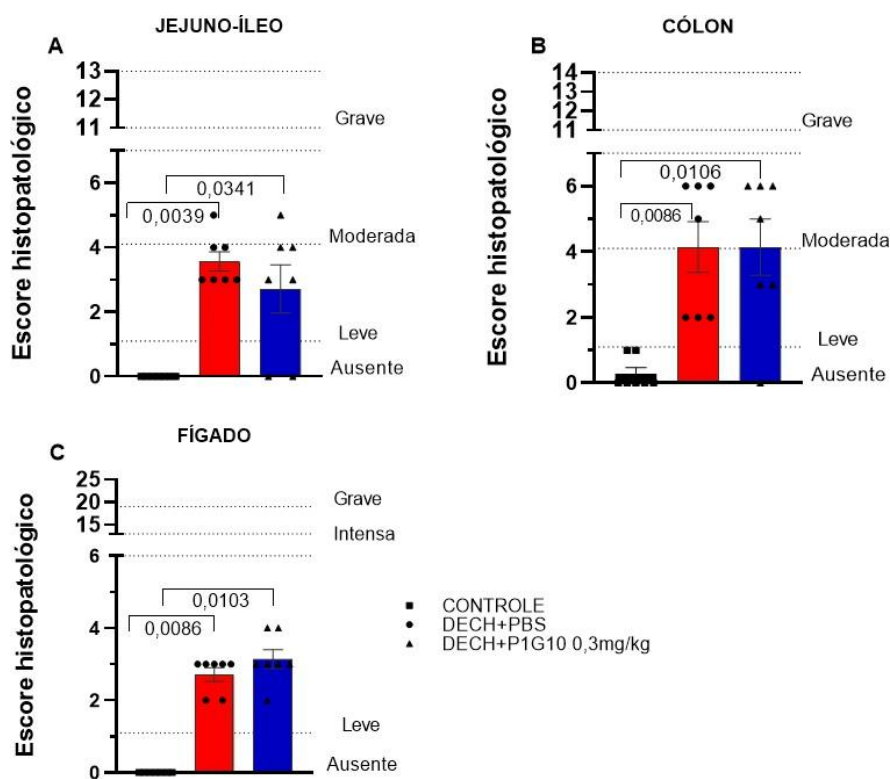
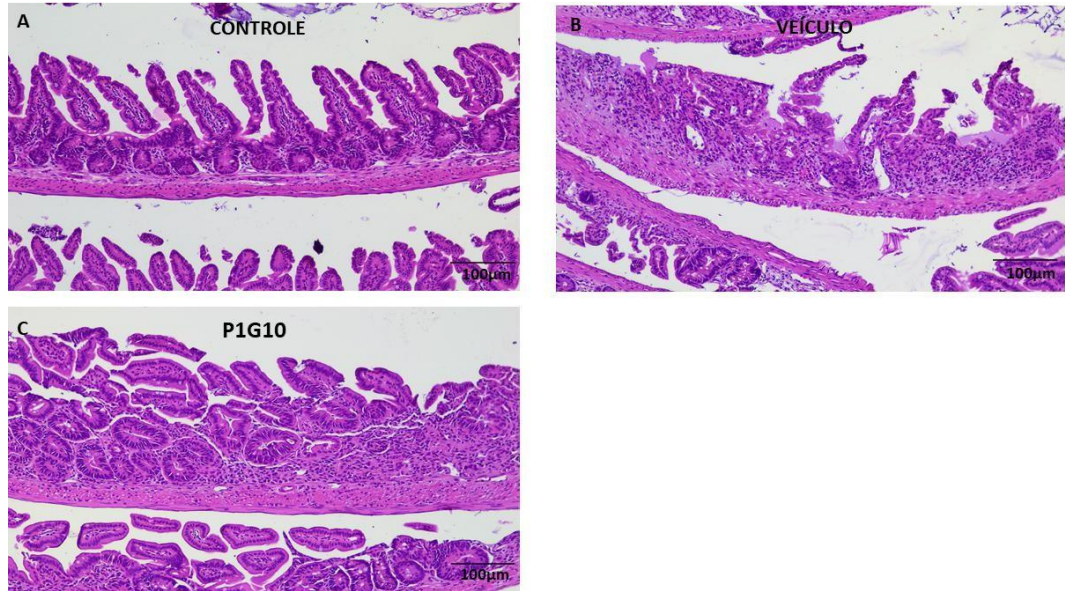
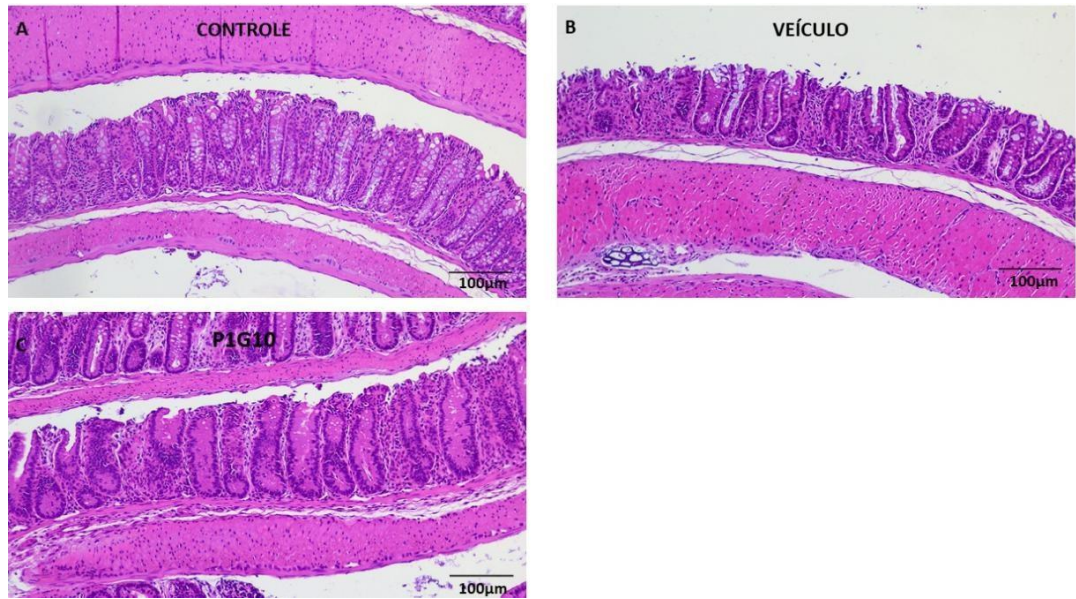


Figura 39. A P1G10 não evitou a lesão histopatológica dos camundongos submetidos à DECH no jejuno-íleo, cólon e fígado. Análise estatística dos danos histológicos. (A) Análise estatística do escore histológico de

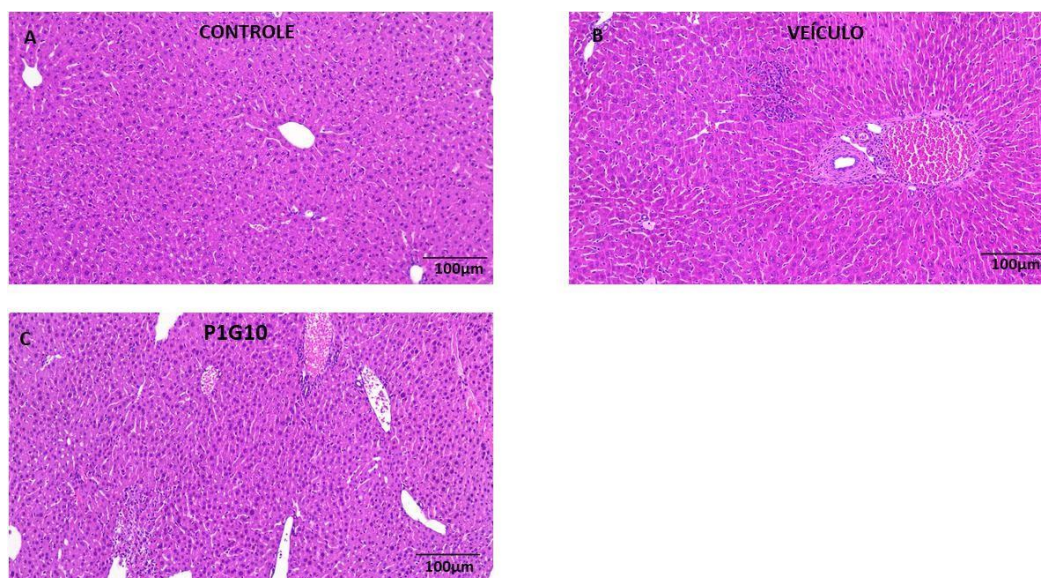
cortes de jejuno-íleo. (B) Análise estatística do escore histológico de cortes de cólon. (C) Análise estatística do escore histológico de cortes do fígado. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM  $P < 0.05$  por One-way-ANOVA.



**Figura 40. Imagens representativas do jejuo-íleo.** (A) Imagem representativa do grupo controle TCTH singênico. (B) Imagem representativa do grupo veículo. (C) Imagem representativa do grupo tratado com P1G10 0,3mg/kg.



**Figura 41. Imagens representativas do cólon.** (A) Imagem representativa do grupo controle TCTH singênico. (B) Imagem representativa do grupo veículo. (C) Imagem representativa do grupo tratado com P1G10 0,3mg/kg.

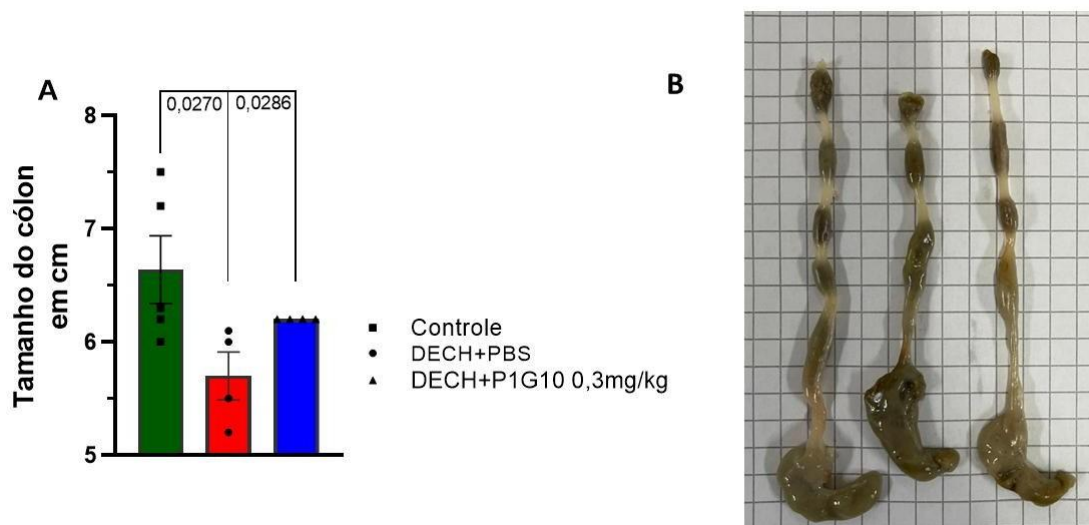


**Figura 41. Imagens representativas do fígado.** (A) Imagem representativa do grupo controle TCTH singênico. (B) Imagem representativa do grupo veículo. (C) Imagem representativa do grupo tratado com P1G10 0,3mg/kg.

#### 5.14. AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO COLON DE ANIMAIS COM DECH

Uma das principais estratégias para avaliar a colite em modelos experimentais com camundongos é a análise morfométrica do cólon, uma vez que processos inflamatórios intestinais acarretam redução significativa no comprimento do órgão (IACCARINO et al., 2019).

Neste estudo, realizamos a análise morfométrica comparativa do cólon entre três grupos experimentais: animais controles (TCTH singênico), DECH+PBS e DECH+P1G10. A mensuração cuidadosa do comprimento colônico permitiu quantificar indiretamente a gravidade da inflamação, considerando que cólons saudáveis mantêm sua arquitetura alongada. Os resultados indicam que os animais DECH+PBS apresentam o cólon menor em relação aos animais DECH+P1G10 ( $p < 0,05$ ), o grupo veículo também apresenta o cólon menor que os animais controle que são submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas ( $p < 0,05$ ) (Fig 45 A e B).

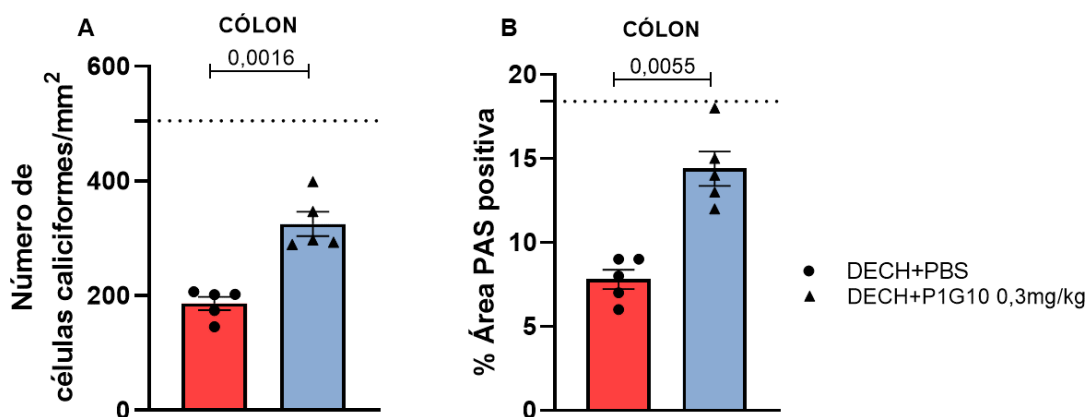


**Figura 44. A P1G10 preveniu a redução no tamanho do cólon em animais com DECH.** (A) Tamanho do cólon dos grupos controle, DECH+PBS e DECH+P1G10 (B) Imagem representativa do tamanho do cólon da esquerda para direita grupo controle, DECH+PBS e DECH+P1G10 0,3mg/kg. Número de animais na morfometria do cólon: CONTROLE n=5, DECH+PBS n=5, DECH+P1G10 n=5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por one-way-ANOVA.

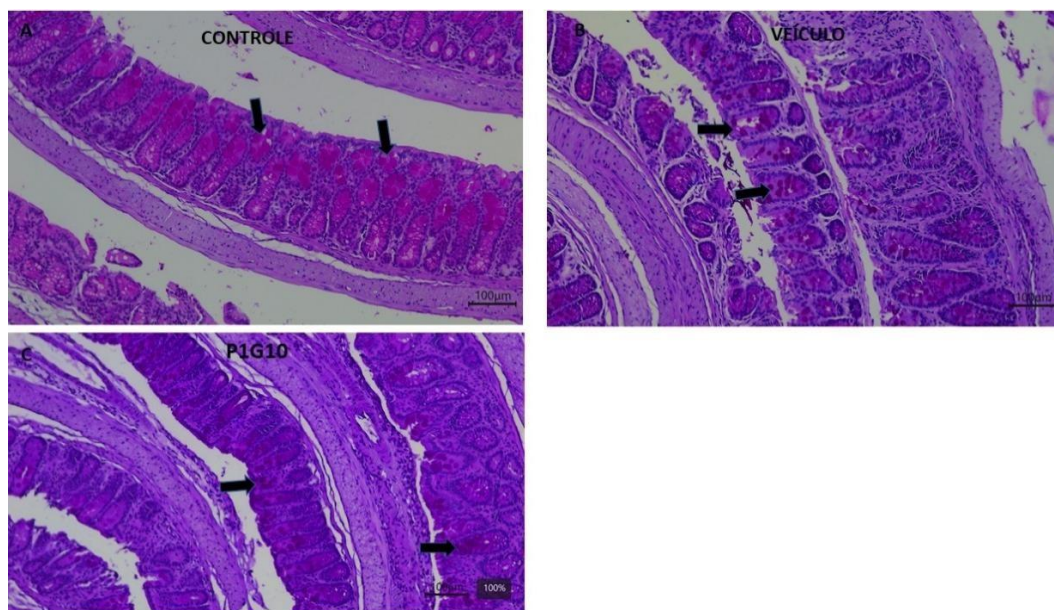
#### 5.15. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES NO JEJUNO-ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS COM DECH

A camada de muco que recobre as superfícies mucosas, particularmente no trato gastrointestinal, é essencial para a homeostase e a defesa do hospedeiro. Composta principalmente por mucinas, glicoproteínas altamente glicosiladas secretadas pelas células caliciformes, essa barreira viscosa atua como a primeira linha de proteção contra patógenos, impedindo a adesão e a translocação bacteriana do lúmen intestinal para os tecidos subjacentes. Na DECH ocorre uma destruição massiva das células caliciformes, resultando na depleção da camada de muco e na exposição direta do epitélio intestinal à microbiota luminal (ERIGUCHI et al., 2012; ARA, 2020).

A marcação com PAS foi realizada em toda a extensão do intestino. No jejuno-íleo, a análise não revelou diferenças estatisticamente significativas na quantidade de células caliciformes entre os animais com DECH tratados com veículo (PBS) e os tratados com P1G10 (0,3 mg/kg). Entretanto, no cólon, observou-se um aumento significativo no número de células caliciformes nos animais que receberam P1G10 em comparação ao grupo DECH+PBS ( $p < 0,05$ ) (Fig 43 A). Além disso, a área positiva para PAS, também, foi maior nesses animais, indicando um possível efeito na preservação das células caliciformes na região distal do intestino ( $p < 0,05$ ) (Fig. 43 B).



**Figura 43. A PIG10 preveniu a redução de células caliciformes no cólon de camundongos submetidos à DECH.** Quantificação das células caliciformes com corante Ácido Periódico de Schiff (PAS). (A) Quantificação de células caliciformes no cólon por mm<sup>2</sup> (B) % de área positiva para PAS. Após a indução da DECH os camundongos foram eutanasiados no 15º dia e foram coletadas amostras do jejuno-íleo. Para avaliação das células caliciformes foi realizada a coloração de PAS no tecido. Número de animais avaliados: controle n=5 DECH+PBS n= 05, DECH+PIG10 n=05. Os resultados são apresentados como média ± SEM e  $p < 0.05$  por test T student.



**Figura 44. Cortes do cólon por coloração PAS para análise de células caliciformes.** As células caliciformes evidenciadas com coloração púrpura. (A) Controle TCTH singênico (B) Veículo (C) PIG10 0,3mg/kg.

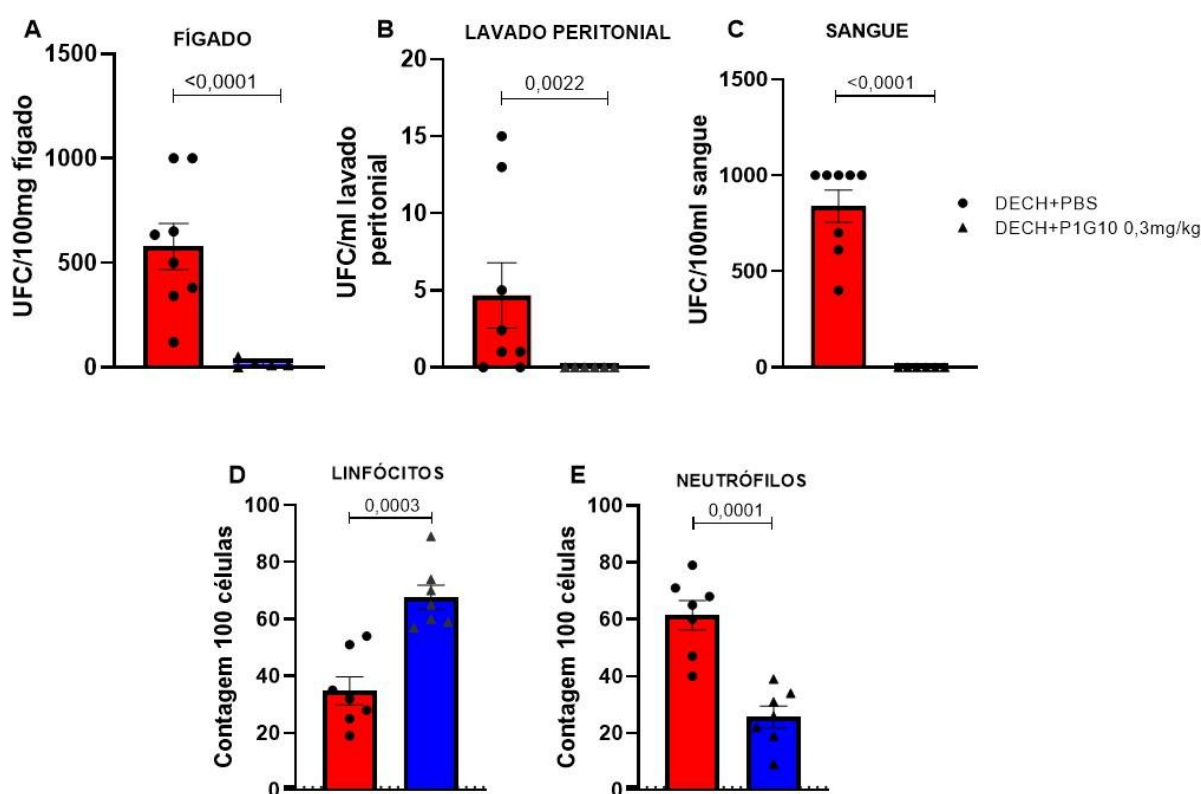
#### 5.16. AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA-EIXO-INTESTINO, CAVIDADE PERITONIAL, FÍGADO E CORRENTE SANGUÍNEA

A translocação bacteriana é um achado frequente em animais com DECH, decorrente principalmente da destruição do epitélio intestinal. A inflamação exacerbada promove: perda de células caliciformes (redução da camada de muco protetor), danos às tight junctions (aumentando a permeabilidade), e disbiose (crescimento de patógenos oportunistas). Essas

alterações permitem que bactérias do lúmen intestinal migrem para a circulação sistêmica, agravando a resposta inflamatória (TU et al., 2016; ARA et al., 2020).

Para investigar o efeito preventivo do tratamento com a fração proteolítica P1G10 sobre a translocação bacteriana, foi realizada a análise da presença de microrganismos no fígado, no lavado peritoneal e na corrente sanguínea dos animais. Os resultados demonstraram que os camundongos tratados com P1G10 não apresentaram crescimento bacteriano nos locais avaliados (Fig. 45 A, B e C), em contraste significativo com os animais que receberam apenas o veículo, nos quais foi observada presença de bactérias (Fig. 45 A, B e C). A análise estatística confirmou a eficácia do tratamento, com valores de  $p$  altamente significativos para o fígado ( $p < 0,0001$ ), o lavado peritoneal ( $p < 0,05$ ) e o sangue ( $p < 0,0001$ ).

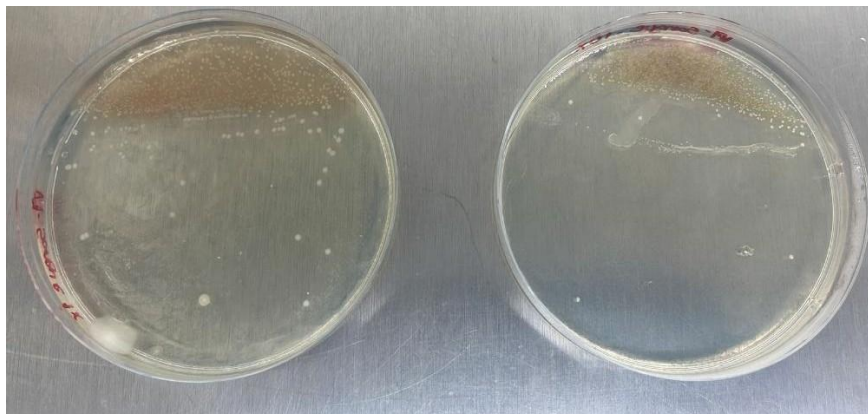
Outro dado que corrobora os resultados obtidos neste experimento é a contagem diferencial realizada em lâmina hematológica. Os resultados evidenciaram que os animais com DECH tratados com PBS apresentaram níveis de neutrófilos circulantes ( $p < 0,001$ ) significativamente superiores em comparação ao grupo DECH tratado com P1G10 (0,3 mg/kg) ( $p < 0,001$ ) (Fig. 45 D-E).



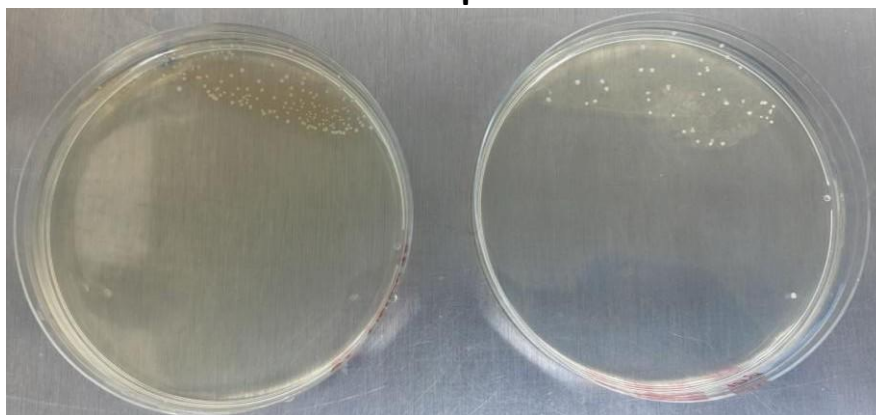
**Figura 45. A P1G10 previniu a translocação bacteriana em camundongos com DECH.** Avaliação da translocação bacteriana nos animais por plantio bacteriológico (UFC). (A) Fígado (B) Lavado peritoneal (C) Sangue (D) Número de linfócitos em contagem de lâmina hematológica (E) Número de neutrófilos em lâmina hematológica. Os dados são de dois experimentos independentes que foram agrupados. Número de animais

testados no período de 8 dias:  $n=9$ ; Número de animais testados no período de 08 dias: controle  $n=7$ . Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM e  $p < 0.05$  por test T student.

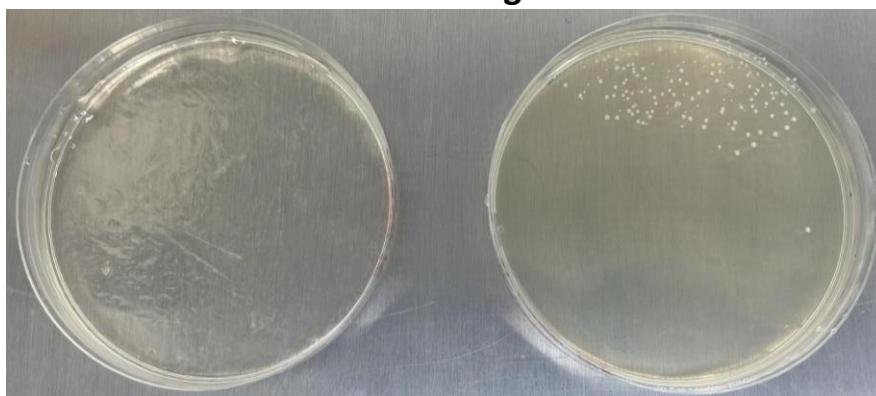
### DECH+PBS sangue



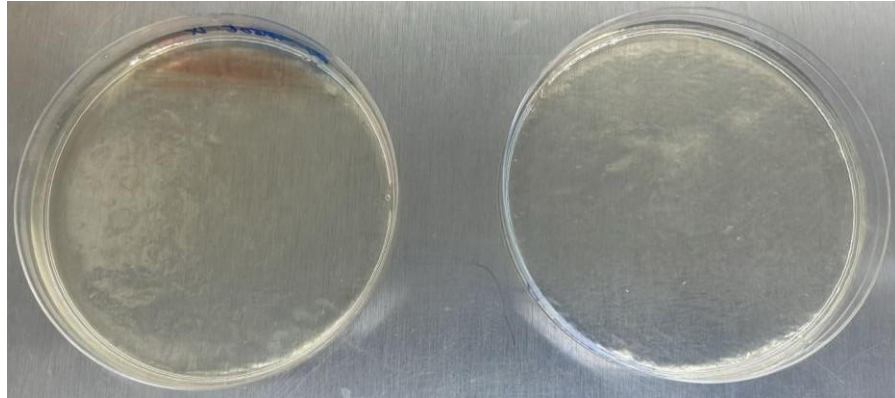
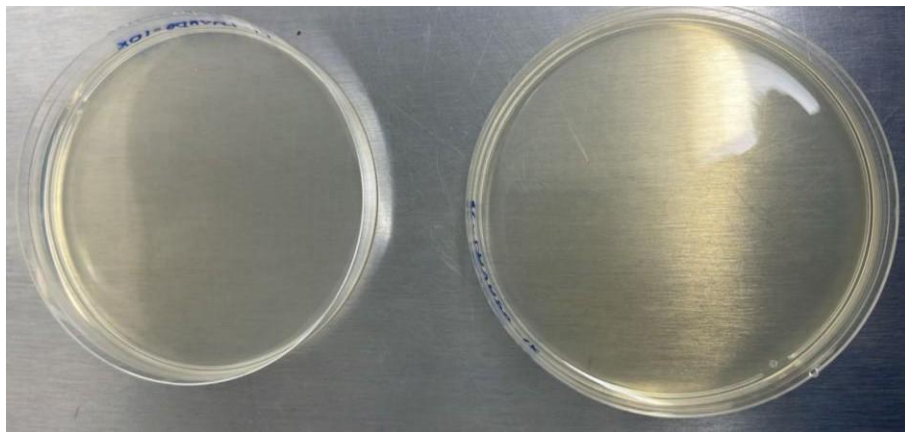
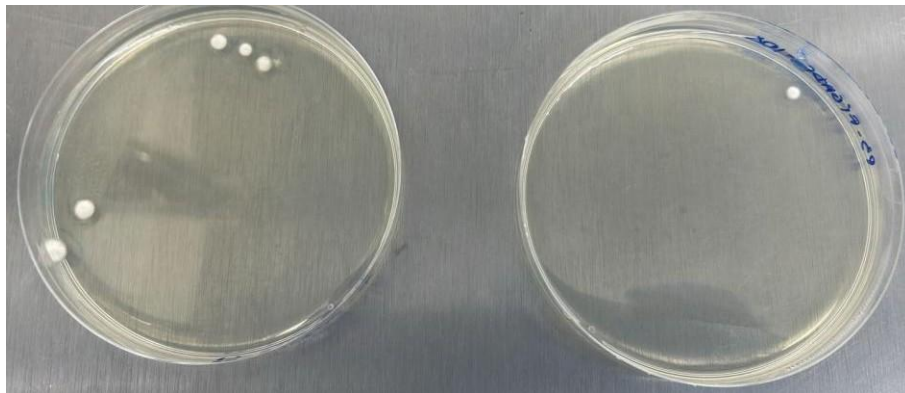
### DECH+PBS peritonal



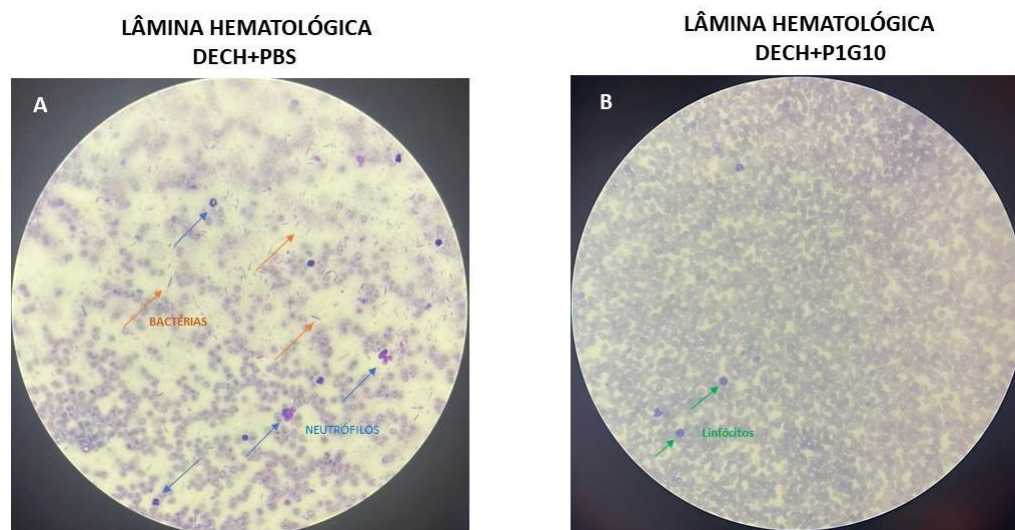
### DECH+PBS fígado



**Figura 47. Placas de Petri com meio de cultura Muller Hinton cultivadas com material biológico. (A) Sangue DECH+PBS (B) Lavado peritonal DECH+PBS (C) Fígado DECH+PBS.**

**DECH+P1G10 sangue****DECH+P1G10 lavado peritoneal****DECH+P1G10 fígado**

**Figura 48. Placas de Petri com meio de cultura Muller Hinton cultivadas com material biológico. (A) Sangue DECH+P1G10 (B) Lavado peritoneal DECH+P1G10 (C) Fígado DECH+P1G10.**

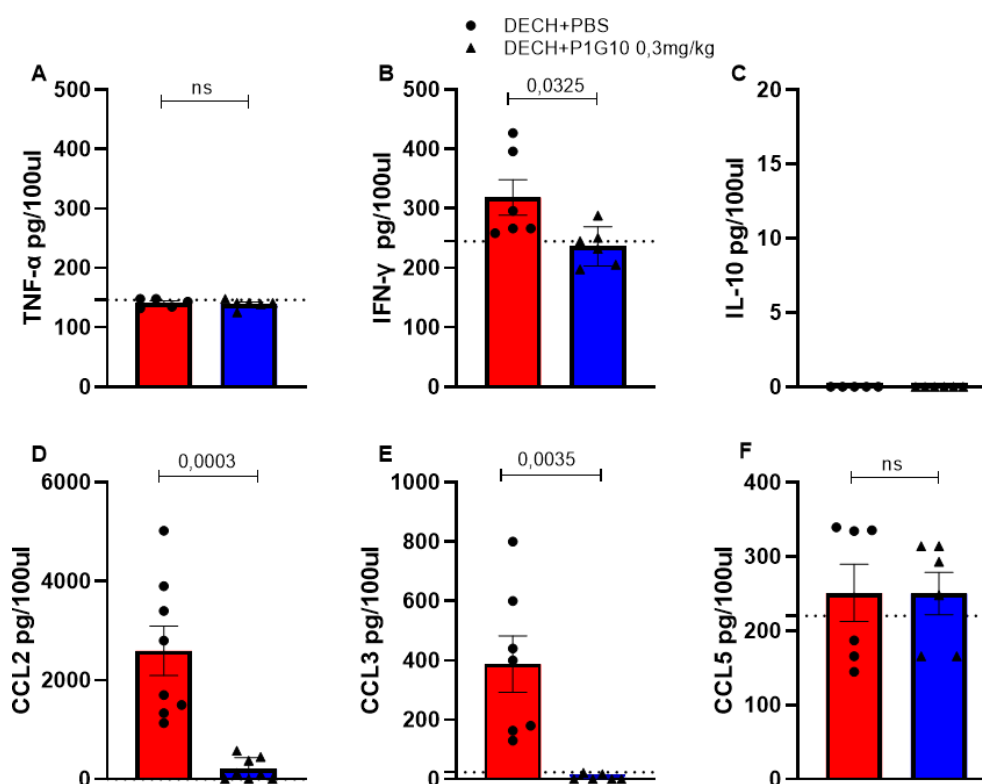


**Figura 49. Lâminas hematológicas (esfregaço sanguíneo).** (A) DECH+PBS (B) DECH+P1G10.

#### 5.17.EFEITO DO TRATAMENTO COM P1G10 NOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA CIRCULAÇÃO SISTÊMICA

A quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3 e CCL5 no sangue de camundongos com DECH é crucial para entender a dinâmica inflamatória sistêmica. Essas moléculas atuam como mediadoras-chave no recrutamento e ativação de células T e macrófagos, direcionando-os para órgãos-alvo (como intestino e fígado), perpetuando a resposta imune desregulada (CASTOR, 2012; REISCHL, 2021).

A fim de avaliar o impacto da DECH na resposta inflamatória sistêmica, quantificamos os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3 e CCL5 por ELISA, comparando as concentrações entre os grupos tratado e veículo. Os resultados indicaram uma redução nos níveis de citocina IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 50 B) no soro dos animais tratados com P1G10 (0,3 mg/kg) em comparação com os animais que receberam apenas o veículo (PBS). No entanto, não foi observada diferença significativa na produção de TNF- $\alpha$  entre os grupos. Quanto à citocina IL-10, não houve detecção de níveis de produção nos grupos analisados (Fig. 50 B e C). Em relação às quimiocinas, observamos uma diminuição significativa nos níveis de CCL2 ( $p < 0,001$ ) e CCL3 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 50 D e E) em animais tratados com P1G10. Os níveis de CCL5 não mostraram diferença estatística relevante entre os grupos (Fig. 50 F).



**Figura 50. A P1G10 diminuiu os níveis séricos da citonina IFN-  $\gamma$  e das quimiocinas CCL2, CCL3 nos camundongos com DECH.** Análise de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL2, CCL3, CCL5 por meio do ensaio de ELISA. (A) Quantidade de TNF- $\alpha$  em pg/100 ul no soro. (B) Quantidade de IFN- $\gamma$  em pg/100 ul no soro. (C) Quantidade de IL-10 em pg/100 ul soro. (D) Quantidade de CCL2 em pg/100ul no soro. (E) Quantidade de CCL3 em pg/100 ul no soro. (F) Quantidade de CCL5 em pg/100 ul no soro. Número de animais avaliados quanto às citocinas e quimiocinas: controle n=06, DECH+PBS n=08 DECH+P1G10 n=8. Os dados apresentados correspondem à média e erro padrão da média. P < 0,05 comparação com grupo DECH+PBS pelo teste T de Student.

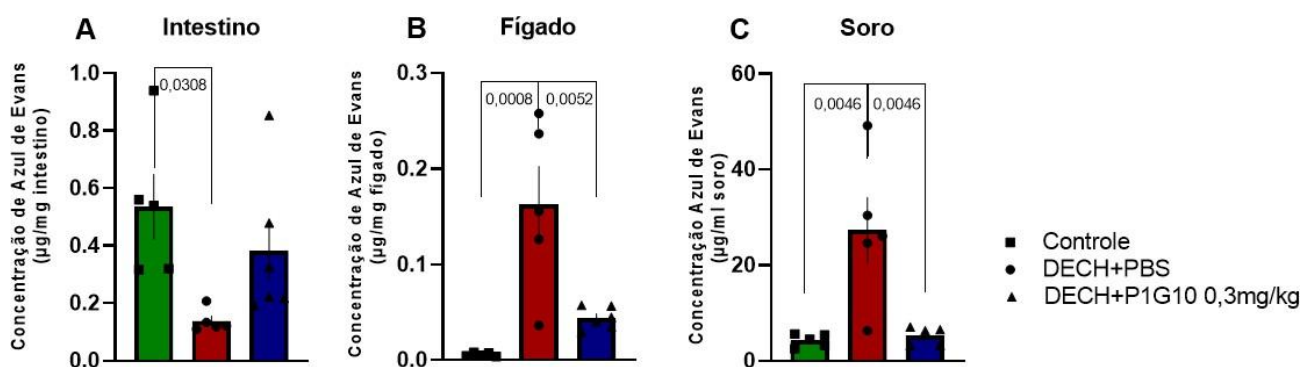
## 5.18. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM P1G10

A disfunção da barreira intestinal, frequentemente associada à DECH, leva ao aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a translocação de microrganismos e seus produtos, o que intensifica a inflamação e agrava a progressão da doença. Assim, a avaliação da integridade da barreira intestinal por meio de ensaios de permeabilidade representa uma ferramenta essencial para compreender a fisiopatologia da DECH e investigar intervenções terapêuticas capazes de preservar ou restaurar a integridade do órgão-alvo (MARKUS, 2010; MALARD, 2023).

A avaliação da permeabilidade intestinal, realizada por meio da quantificação do corante azul de Evans, revelou alterações significativas entre os grupos experimentais. No intestino (Fig. 51A), observou-se um aumento da permeabilidade no grupo DECH+PBS em comparação ao grupo controle (p < 0,05), indicando maior dano ao epitélio intestinal e extravasamento

vascular acentuado. No fígado (Fig. 51B), a concentração de azul de Evans foi significativamente superior no grupo DECH+PBS em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Além disso, ao compararmos o grupo DECH+PBS com o grupo DECH+P1G10, também foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o extravasamento vascular intestinal favoreceu a permeação do corante até o fígado, refletindo o comprometimento da barreira epitelial.

No soro (Fig. 51C), foi detectado um aumento expressivo da concentração de azul de Evans no grupo DECH+PBS em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), demonstrando o impacto do extravasamento vascular na circulação sistêmica dos animais tratados apenas com o veículo. Comparações entre os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10 revelaram diferenças estatísticas semelhantes às observadas na comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), indicando que o tratamento com P1G10 atenuou a permeabilidade vascular sistêmica.



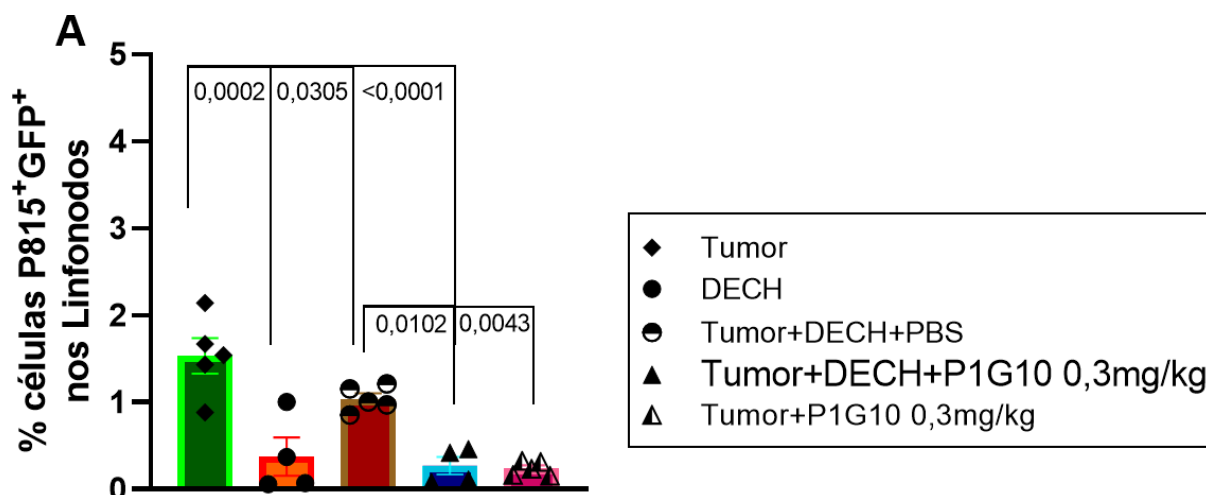
**Figura 51. A P1G10 protegeu os camundongos com DECH da permeabilidade intestinal, hepática e sistêmica.** A concentração do corante azul de Evans foi mensurada nos tecidos do intestino (A), fígado (B) e no soro (C) como indicador da permeabilidade vascular. Animais do grupo DECH+PBS apresentaram aumento significativo da permeabilidade em todos os compartimentos avaliados em comparação ao grupo controle. O tratamento com a fração proteolítica P1G10 (0,3 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a concentração do corante no fígado e no soro. Controle n=5 DECH+PBS n=5 DECH+P1G10 n=7. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo por multiplas comparações One-way-Anova.

### 5.19. A PRESERVAÇÃO DO EFEITO ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA

O efeito enxerto-contra-leucemia (*GVL graft-versus-leukemia*) representa um dos pilares terapêuticos mais relevantes nos transplantes alogênicos, especialmente em neoplasias hematológicas. Esse fenômeno ocorre quando células imunes do enxerto reconhecem e eliminam células tumorais do hospedeiro, promovendo controle tumoral duradouro. Preservar esse efeito benéfico, ao mesmo tempo em que se busca reduzir a toxicidade da DECH, é um dos maiores desafios clínicos na área.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento com a fração proteolítica P1G10 interfere na resposta do efeito enxerto-contra-leucemia (ECL), utilizando células de mastocitoma P815+GFP+. Para isso, empregou-se a técnica de citometria de fluxo para analisar os linfonodos inguinais e mesentéricos dos diferentes grupos experimentais, conforme descrito em Materiais e Métodos. A administração de P1G10 (0,3 mg/kg) não comprometeu a eficácia do ECL. Observou-se que o grupo Tumor apresentou maior porcentagem de células tumorais nos linfonodos em comparação ao grupo DECH ( $p < 0,001$ ), ao grupo Tumor+DECH+PBS ( $p < 0,05$ ) e ao grupo Tumor+DECH+P1G10 ( $p < 0,0001$ ), confirmando a capacidade da DECH em promover a eliminação das células tumorais (Fig. 52).

Além disso, o grupo Tumor+DECH+P1G10 apresentou uma redução ainda mais acentuada na porcentagem de células tumorais em relação ao grupo DECH sozinho ( $p < 0,0001$ ), evidenciando que o tratamento com P1G10 não apenas preservou, como potencialmente contribuiu para a ação antitumoral. Comparações entre os grupos Tumor+DECH+PBS e Tumor+DECH+P1G10 também revelaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), assim como entre Tumor+P1G10 e Tumor+DECH+P1G10 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 52).



**Figura 52. O tratamento com P1G10 não interfere no efeito enxerto-contra-leucemia.** (A) Gráfico da frequência das células P815+GFP+ nos linfonodos em amostras derivadas de linfonodos inguinais e mesentéricos dos grupos Tumor n=5, DECH n=4, Tumor+DECH+PBS n=5, Tumor+DECH+P1G10 n=5, Tumor+P1G10 n=5. O gráfico está expresso em dispersão e mediana, os grupos foram considerados diferentes para  $p < 0,05$  por One-way-nova múltiplas comparações.

## 6. DISCUSSÃO

A presente discussão tem como ponto de partida o objetivo central deste estudo: avaliar o efeito da fração proteolítica de cisteíno proteases (P1G10) no tratamento da doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda (DECH), com ênfase na resposta inflamatória associada à doença que acomete os órgãos-alvo intestino e fígado. Dada a complexidade da DECH e seu impacto sistêmico, compreender a modulação do processo inflamatório nesses tecidos é fundamental para encontrar possíveis mecanismos terapêuticos (SHULMAN et al., 2015). Assim, os achados deste estudo são analisados à luz da literatura existente e dos experimentos realizados, buscando interpretar a influência da P1G10 sobre a dinâmica inflamatória e suas potenciais implicações no tratamento da doença

No ano de 1995, o pesquisador Krenger contribuiu de maneira significativa para a consolidação dos modelos experimentais murinos utilizados no estudo da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) aguda, ao desenvolver um modelo robusto e amplamente referenciado na literatura. Nesse modelo, camundongos foram previamente submetidos à radiação corporal total, seguida pelo transplante de células da medula óssea provenientes de doadores alogênicos, isto é, geneticamente distintos dos receptores (KRENGER et al., 1995; WILL; WYNN, 2006). A partir dessa formulação, diversos modelos murinos foram estabelecidos com o objetivo de investigar a fisiopatologia e as manifestações clínicas da DECH, embora haja consenso na literatura quanto à necessidade de se adotar uma abordagem padronizada para a avaliação da progressão da doença. Tal avaliação fundamenta-se na análise criteriosa da escala clínica aplicada aos camundongos submetidos aos protocolos experimentais, considerando parâmetros bem definidos, conforme descrito na Tabela 1.

O modelo utilizado no nosso estudo baseia-se no transplante de duas populações celulares distintas: os esplenócitos e as células da medula óssea do doador. A utilização concomitante dessas linhagens garante que os linfócitos T maduros, provenientes do baço, exerçam seu papel central na fisiopatologia da DECH, desencadeando uma resposta alogênica característica da doença. Paralelamente, as células da medula óssea desempenham um papel crucial na reconstituição do sistema hematopoiético do receptor, previamente submetido a regime de condicionamento por irradiação, que resulta na ablação completa da medula óssea. Essa estratégia é fundamental para assegurar a progressão adequada do modelo experimental, permitindo a análise precisa da interação entre as células doadoras e as células do hospedeiro (EDINGER et al., 2003; SCHWARTE et al., 2007; SCHROEDER et al., 2011). O modelo experimental empregado neste estudo apresenta elevada reprodutibilidade na indução e

avaliação da doença, sendo amplamente utilizado tanto pelo nosso grupo de pesquisa quanto por colaboradores em diferentes investigações direcionadas à identificação de agentes terapêuticos com potencial para o tratamento de pacientes refratários à terapia convencional baseada em corticosteroides (CASTOR et al., 2011; REZENDE et al., 2013; REZENDE et al., 2015; VRIESENDORP; HEIDT, 2016; BERG et al., 2023).

Todavia, é reconhecido que modelos experimentais apresentam limitações intrínsecas em estudos translacionais. No caso específico deste modelo, destaca-se a disparidade imunológica entre camundongos e seres humanos. O sistema imunológico murino difere significativamente do humano, seja na expressão de moléculas de superfície, na cinética das respostas imunes ou na regulação de vias inflamatórias, o que pode comprometer a extrapolação direta dos resultados para a fisiopatologia da DECH em pacientes. Além disso, a complexidade da DECH humana influenciada por fatores como idade, comorbidades, condicionamento pré-transplante e diversidade genética do sistema HLA, contrasta com a homogeneidade genética e a ausência de comorbidades nos modelos murinos, podendo subestimar a variabilidade e a gravidade da doença observada em contextos clínicos reais (KING, 2008; ALI, 2012;).

Considerando as características e a robustez do modelo experimental empregado para o desenvolvimento da DECH aguda, foi possível estabelecer um cenário controlado e reprodutível para a avaliação de potenciais intervenções terapêuticas. O modelo experimental adotado neste estudo utiliza animais controle submetidos à irradiação (regime de condicionamento) e subsequentemente ao transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) singênicas, os quais demonstram reconstituição adequada do sistema imunológico sem desenvolvimento de doença. Em contraste, os animais que receberam transplante alogênico de esplenócitos e medula óssea desenvolveram DECH aguda, caracterizando os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10. Os dois grupos, que reproduzem a doença, foram utilizados como parâmetros comparativos por meio do teste T na maioria dos experimentos, consolidando-se como o foco principal da investigação.

A determinação da eficácia terapêutica da fração proteolítica P1G10 teve início com a condução de um ensaio de curva dose-resposta, no qual foram avaliadas três concentrações diferentes em progressão logarítmica (0,3; 3,0 e 30,0 mg/kg). A escolha dessas doses fundamentou-se em dados prévios obtidos em modelo de colite murina induzida por TNBS, nos quais a fração demonstrou propriedades anti-inflamatórias relevantes, como o aumento da produção de IL-10 e a promoção da reparação tecidual no cólon, além de favorecer o ganho ponderal nos animais tratados com 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Esses resultados prévios ofereceram suporte científico para a investigação da P1G10 no contexto da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

A avaliação da eficácia foi realizada por meio do monitoramento sistemático dos parâmetros clínicos dos animais ao longo de 18 dias, empregando uma escala clínica padronizada (descrita na Tabela 1, em Materiais e Métodos). Foram analisados sinais clínicos característicos da DECH, como perda de peso, postura encurvada, piloereção, integridade da pele, consistência fecal e nível de atividade, parâmetros amplamente utilizados para avaliação da gravidade da doença em modelos experimentais. A perda ponderal foi igualmente considerada como um marcador sensível da progressão da doença e da resposta ao tratamento (BRYSON, et al., 1989; REZENDE, 2013; BERNARDES, 2015; BEVAN et al., 2017). Para a condução do experimento, foram estabelecidos três grupos: grupo controle (submetido ao transplante singênico), grupo DECH+PBS (tratado apenas com o veículo) e grupos DECH tratados com as diferentes doses de P1G10.

Os resultados demonstraram que a dose de 0,3 mg/kg de P1G10 foi a mais eficaz entre as concentrações testadas. Animais tratados com essa dose apresentaram escores clínicos semelhantes aos do grupo controle, menor variação de peso corporal e foram os únicos capazes de reverter a perda ponderal, evidenciando uma recuperação mais consistente. A dose de 3,0 mg/kg promoveu diminuição da escala clínica dos animais com DECH, porém de maneira inferior a dose de 0,3 mg/kg. Em contrapartida, a dose de 30,0 mg/kg não impediu a progressão clínica da DECH, assim os resultados evidenciam superior potencial terapêutico da dose mais baixa testada.

Os animais do grupo DECH+PBS, que receberam apenas o veículo, apresentaram uma piora clínica progressiva a partir do segundo dia após a indução da doença, com elevação gradual e sustentada dos escores clínicos. Esse grupo atingiu os maiores valores entre os dias 8 e 12, mantendo altos níveis até o final do experimento. A primeira morte foi registrada no sétimo dia, e a mortalidade total ocorreu até o décimo sexto dia, refletindo a gravidade da DECH não tratada. No grupo DECH+P1G10 30,0 mg/kg, observou-se uma progressão clínica ainda mais acentuada, com escores superiores ao grupo DECH+PBS a partir do oitavo dia, mantendo-se elevados até o final do protocolo. Apesar de a primeira morte nesse grupo ter ocorrido somente no nono dia, a piora clínica foi tão significativa que um animal precisou ser eutanasiado no décimo oitavo dia. Esses dados reforçam que a dose mais alta de P1G10 não apenas falhou em atenuar os sintomas clínicos da DECH, como também pode ter agravado a condição dos animais.

A análise da área sob a curva da escala clínica, representada no gráfico, permitiu avaliar de forma integrada a progressão e a gravidade da DECH nos diferentes grupos experimentais. Os dados demonstraram que a administração da fração proteolítica P1G10 na dose de 0,3 mg/kg foi a mais eficaz na atenuação dos sinais clínicos da doença. Essa dose promoveu uma redução significativa da área sob a curva em comparação às demais doses testadas, aproximando-se dos valores observados no grupo controle. O resultado indica que a dose de 0,3 mg/kg foi capaz de modular de maneira eficiente a resposta inflamatória associada à DECH, sem induzir efeitos colaterais aparentes, o que sugere um equilíbrio adequado entre a atividade imunomoduladora e a preservação da homeostase do hospedeiro. Por outro lado, as doses mais elevadas de P1G10 (3,0 mg/kg e 30,0 mg/kg) apresentaram áreas sob a curva superior àquela obtida com a dose de 0,3 mg/kg, refletindo perda parcial ou completa do efeito protetor. Esses achados sugerem que a eficácia terapêutica de P1G10 segue um perfil dose-dependente não linear, em que concentrações mais altas não apenas deixaram de conferir proteção, mas também podem ter exacerbado a resposta inflamatória, evidenciando a existência de uma janela terapêutica estreita para o uso da fração proteolítica (LIN, 1994).

Com base nos resultados do experimento inicial de curva dose-resposta, a dose de 0,3 mg/kg de P1G10 foi identificada como a mais eficaz na atenuação dos sinais clínicos da DECH, promovendo melhor controle da progressão da doença e manutenção da estabilidade clínica dos animais. Diante dessa superioridade, essa dose foi selecionada para os experimentos subsequentes, sendo utilizada como protocolo de tratamento padrão nos demais ensaios conduzidos.

Com a definição da dose de 0,3 mg/kg de P1G10 como a mais eficaz no controle da DECH, buscamos, em seguida, investigar os efeitos desse tratamento sobre o baço dos animais. O objetivo foi comparar os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10 0,3 mg/kg, a fim de avaliar se o tratamento influenciava o perfil celular do órgão, especialmente no contexto da ativação e expansão de células T, que desempenham papel central na fisiopatologia da DECH. O baço, por ser um órgão linfóide secundário fundamental na resposta imune adaptativa, pode refletir diretamente a intensidade da ativação imunológica sistêmica (VARGA et al., 2018; HARA et al., 2008; BOTTEGA et al., 2021).

Inicialmente, a avaliação morfométrica do baço revelou dados relevantes sobre a progressão da DECH e os efeitos do tratamento com P1G10. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas no tamanho do órgão entre os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10, a análise do peso esplênico mostrou um achado intrigante: os animais tratados com P1G10 apresentaram baços com peso significativamente menor,

comparável ao do grupo controle saudável, enquanto o grupo DECH+PBS exibiu um aumento expressivo no peso do órgão. Além da diferença ponderal, o grupo DECH+PBS apresentou alterações macroscópicas notáveis, com a presença de áreas esbranquiçadas difusas na superfície esplênica, um padrão morfológico distinto da arquitetura homogênea observada nos grupos controle e tratado com P1G10. Estas alterações sugerem modificações teciduais, possivelmente decorrentes de processos inflamatórios crônicos, fibrose reativa, remodelamento do parênquima esplênico, infiltrado celular anormal. Estes achados morfológicos estão em concordância com relatos prévios que associam a DECH a alterações estruturais no baço, onde o aumento de peso e as alterações macroscópicas refletiriam o estado hiperinflamatório característico da doença (SILVA et al., 2013; ITAWI et al., 2022). A normalização desses parâmetros no grupo tratado com P1G10 sugere que a fração pode estar modulando ativamente estes processos patológicos, prevenindo as alterações teciduais associadas à DECH.

A análise das células do baço por citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de investigar diferenças na produção e ativação de células T e macrófagos entre os grupos experimentais DECH+PBS e DECH+P1G10. Os resultados da citometria de fluxo mostraram alterações significativas no perfil de células T no grupo tratado com DECH+P1G10 (0,3 mg/kg) em comparação ao grupo DECH+PBS. Observou-se uma redução na frequência de células T CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , citocinas cruciais, tanto nas fases iniciais, quanto na progressão da doença. Além disso, houve diminuição nas populações de células T CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, igualmente produtoras dessas mesmas citocinas pró-inflamatórias.

Por outro lado, em relação às células T reguladoras (Tregs), caracterizadas pela expressão dos marcadores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10, os dados revelaram um aumento na unidade média de fluorescência (MFI) de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no grupo DECH+P1G10. Também foi detectado um incremento no MFI de células dessa mesma linhagem que expressam FoxP3 e produzem IL-10. A expansão de Tregs no baço pode exercer um efeito protetor, suprimindo respostas imunes desreguladas e promovendo tolerância imunológica. Estudos em modelos experimentais de DECH mostram que a depleção de Tregs está associada a maior mortalidade, reforçando seu papel crítico na modulação da doença (RAMADAN; PACZESNY, 2015).

Embora não existam na literatura estudos prévios que avaliem especificamente o efeito da fração proteolítica P1G10 sobre populações de células T, nos modelos de DECH, é amplamente reconhecido que essas células desempenham papel central na fisiopatologia da doença. A ativação exacerbada de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> promove inflamação tecidual intensa, sendo a polarização dessas células em subtipos efetores, como Th1, T citotóxicas

(CTLs) e TH17, diretamente associada à liberação de citocinas inflamatórias, como IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que amplificam a resposta inflamatória e contribuem para a lesão dos órgãos-alvo. Dessa forma, a atenuação da ativação de células T é um mecanismo chave na redução da gravidade da DECH (LUFT, 2007; LI, 2011; FU, 2019; ASHAYERIPANAH; VILLADANGOS, 2024).

Apesar da ausência de investigações diretas em modelos de DECH, estudos prévios demonstram que a fração P1G10 possui notável capacidade imunomodulatória. Em modelo experimental de queimadura, P1G10 foi capaz de reduzir significativamente a produção de TNF- $\alpha$ , além de diminuir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e catalase (FREITAS et al., 2025). Tais achados indicam que P1G10 atua na contenção do dano tecidual por vias inflamatórias e oxidativas. Ademais, sua eficácia também foi demonstrada em modelo murino de colite induzida por TNBS, no qual promoveu aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10, reforçando seu potencial modulador em processos inflamatórios (ALBUQUERQUE et al., 2020). Portanto, ainda que os efeitos diretos de P1G10 sobre subpopulações de células T na DECH permaneçam pouco explorados, os dados disponíveis sugerem que essa fração proteolítica pode influenciar positivamente o curso da doença, por meio da supressão de mediadores inflamatórios e da modulação imunológica, conforme observado no baço.

Avaliamos também o perfil de macrófagos no baço dos camundongos, observamos uma redução significativa tanto na frequência de macrófagos M1 quanto na intensidade média de fluorescência (MFI) de M1CD86<sup>+</sup> nos animais tratados com P1G10. Tal achado adquire relevância no contexto da DECH, uma vez que os macrófagos M1, de perfil pró-inflamatório, exercem papel fundamental na amplificação da resposta imunológica na fisiopatologia da doença. Os macrófagos são conhecidos por secretarem citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-6, além de expressarem moléculas coestimuladoras como o CD86 e promoverem o aumento da expressão de MHC-II na DECH na presença de IFN- $\gamma$  (ZHOU et al., 2013; HENDEN; HILL, 2015; HUANG et al., 2018; WU et al., 2020).

A capacidade da fração P1G10 em modular a atividade de macrófagos é corroborada por evidências pré-clínicas. Estudos anteriores demonstraram o aumento da atividade da enzima N-acetil-beta-D-glicosaminidase (NAG), uma hidrolase lisossomal amplamente utilizada como marcador funcional de ativação de monócitos/macrófagos, após administração de P1G10. Esse aumento foi registrado tanto em modelo de queimadura cutânea induzida por radiação UVB quanto em modelo de carcinoma mamário (FREITAS et al., 2017), indicando o potencial da

fração em estimular o recrutamento e ativação dessas células, fundamentais na orquestração da resposta inflamatória e imunorregulatória. No modelo de carcinoma mamário 4T1, a P1G10 demonstrou capacidade de reduzir, de forma dose-dependente (21–73%), a produção de *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) por macrófagos peritoneais in vitro, em concentrações de 5 a 50 µg/mL, tanto em monoculturas quanto em co-culturas com células tumorais (Braga, 2013, dados não publicados). Tal resultado sugere uma atuação da fração na modulação do fenótipo macrofágico, suprimindo características associadas à angiogênese tumoral. No modelo de colite induzida por TNBS, previamente mencionado, a administração oral de P1G10 na dose de 0,3 mg/kg também resultou em expressiva redução dos marcadores inflamatórios mieloperoxidase (MPO) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (ALBUQUERQUE et al., 2020). Esses achados reforçam o papel imunomodulador da fração, evidenciando seu potencial em interferir funcionalmente na atividade de macrófagos.

Esses achados reforçam o papel imunomodulador da fração, indicando sua atuação direta sobre a ativação das células T e macrófagos. Considerando a relevância dessas células na orquestração da resposta inflamatória sistêmica, é possível que os efeitos observados no baço reflitam um impacto mais amplo da P1G10 sobre a dinâmica imune envolvida na DECH. Nesse contexto, torna-se fundamental abordar o intestino, órgão-alvo central do presente estudo e um dos tecidos mais afetados na DECH (FERRARA; CHAUDHRY, 2018).

O intestino exerce papel central no equilíbrio imunológico do organismo. Além de suas funções digestivas e absorptivas, atua como uma barreira física e imunológica altamente especializada, regulando a interação entre microrganismos comensais e o sistema imune do hospedeiro, as alterações na barreira pode comprometer a homeostase imune, tornando o intestino um importante articulador da resposta inflamatória sistêmica. Na fisiopatologia da DECH, o intestino é amplamente reconhecido como um dos principais órgãos-alvo, frequentemente acometido por lesões severas. A integridade da mucosa intestinal é comprometida pelo regime de condicionamento pré-transplante, facilitando a translocação de componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), para a circulação sistêmica. Isso desencadeia uma resposta imune exacerbada, com ativação de células T alorreativas e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17, que intensificam a inflamação local, promovem apoptose de células epiteliais e agravam a disfunção da barreira intestinal. Além disso, a perda da homeostase intestinal está associada à redução de células T reguladoras e ao desequilíbrio da microbiota, fatores que contribuem para a perpetuação da doença. Assim, a proteção da mucosa intestinal e o controle da resposta inflamatória nesse órgão são estratégias

cruciais no manejo da severidade da doença (HILL e FERRARA, 2000; SOCIÉ e RITZ, 2014; NAYMAGON, 2017; TKACHEV et al., 2021).

Com o intuito de avaliar a dinâmica dos processos envolvidos no funcionamento e na ativação do sistema imunológico no intestino, utilizamos o protocolo de microscopia intravital. Essa técnica permite a análise em tempo real da dinâmica vascular e da interação leucocitária com o endotélio, sendo uma ferramenta essencial para investigar processos inflamatórios no microambiente tecidual. Estudos experimentais mostram que a avaliação da interação de adesão e rolamento leucocitário possibilita quantificar e caracterizar esses fenômenos de forma dinâmica e em tempo real, fornecendo dados valiosos sobre a gravidade da inflamação e a eficácia de terapias imunomoduladoras. No modelo em questão, estudos evidenciam que a redução da adesão e do rolamento de células linfocitárias no intestino está associada a melhor prognóstico de animais submetidos a DECH. Em particular, no referido estudo, foi utilizado o endocanabinoide anandamida de forma exógena, o que contribuiu para a redução da expressão de Mac-1 $\alpha$  (um receptor de adesão leucocitária), a diminuição na expressão de Mac-1 $\alpha$  resultou em uma menor adesão de células transplantadas nas veias mesentéricas (LO et al., 1991; IVETIC et al., 2019; HONDA et al., 2023; BERG et al., 2023). No entanto, nesse estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10 em relação à adesão e ao rolamento leucocitário nos vasos mesentéricos intestinais, revelando não existir, sob as condições avaliadas, um efeito direto da fração P1G10 sobre a modulação inicial do recrutamento leucocitário nos vasos mesentéricos intestinais.

Posteriormente, analisamos o perfil imunológico intestinal por citometria de fluxo, evidenciando que a DECH aguda intestinal envolve uma resposta inflamatória exacerbada mediada por células T, com destaque para os subtipos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. A ativação dessas células ocorre nos órgãos linfoides secundários, sendo dependente da sinalização coestimuladora mediada pela interação entre o receptor CD28 e as moléculas B7 expressas em células apresentadoras de antígeno, o que é crucial para sua expansão clonal. Após a ativação, essas células migram para os tecidos-alvo, como o intestino, onde se infiltram e atuam como efetoras pró-inflamatórias, secretando citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . (ZEISER; BLAZAR., 2017; ROBAK et al., 2017). As células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> também participam ativamente do processo inflamatório intestinal, exercendo uma função citotóxica direta sobre as células epiteliais. Uma vez ativadas, essas células são capazes de induzir apoptose por dois mecanismos principais: a liberação de granzimas e perforinas, que causam lise celular direta, e a ativação da via Fas/FasL, que desencadeia a morte celular programada. Esses mecanismos contribuem para a destruição do epitélio intestinal, intensificando a resposta inflamatória e promovendo

disfunção tecidual. Assim como as células  $CD4^+CD28^+$ , sua ativação e manutenção dependem de interações coestimuladoras, perpetuando um microambiente inflamatório crônico que agrava a patologia intestinal característica da DECH aguda (FERRARA, 2000; ZEISER; BLAZAR, 2017; MALARD, 2023).

Nos animais do grupo DECH+P1G10 (0,3 mg/kg), a análise por citometria de fluxo no intestino revelou uma redução na ativação de células  $CD4^+CD28^+$  e  $CD8^+CD28^+$ , bem como uma diminuição na produção de  $IFN-\gamma$  pelas células  $CD8^+CD28^+$ , em comparação aos animais do grupo DECH tratados com PBS. Esses dados indicam que o modelo de DECH respondeu à intervenção com a fração proteolítica, sugerindo um efeito imunomodulador da P1G10 sobre a ativação de células T intestinais. Estudos anteriores têm demonstrado que proteases vegetais podem interferir na sinalização de citocinas inflamatórias, incluindo o  $IFN-\gamma$ , uma molécula-chave na ativação do sistema imune celular. A redução na produção de  $IFN-\gamma$  é particularmente relevante, uma vez que essa citocina está associada ao aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), à amplificação da inflamação tecidual e ao recrutamento contínuo de células imunes para o sítio inflamatório. Dessa forma, a diminuição do  $IFN-\gamma$  observada nos animais tratados com P1G10 pode representar um mecanismo eficaz para atenuar a resposta inflamatória exacerbada na mucosa intestinal durante a DECH (JAKSCH; MATTSSON, 2005; SHULMAN *et al.*, 2015).

As células T regulatórias (Tregs), caracterizadas pelo fenótipo  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ , desempenham papel central na manutenção da homeostase imunológica intestinal. Elas atuam na preservação da integridade da barreira epitelial, controlam a ativação de outras células imunes e favorecem a resolução da inflamação crônica por meio de interações com células dendríticas tolerogênicas da mucosa (EDINGER, 2003; MUTIS, 2006; WHITMIRE *et al.*, 2007; RIEGEL, 2020; HEFAZI, 2021).

Nesse estudo, a análise por citometria de fluxo revelou um aumento significativo na frequência de células T  $CD4^+CD25^+$  no intestino dos animais tratados com P1G10, em comparação ao grupo DECH+PBS. Além disso, observou-se um maior índice de fluorescência média (MFI) para CD25, sugerindo não apenas expansão numérica, mas também um potencial aumento do estado de ativação funcional dessas células. Esse resultado é relevante, pois indica que a P1G10 pode favorecer a indução ou manutenção de Tregs no ambiente intestinal inflamatório, um aspecto crucial no contexto da DECH, onde a presença dessas células tem sido correlacionada com menor gravidade da doença (MACMILLAN *et al.*, 2015; CHOPRA *et al.*, 2016; DANT *et al.*, 2017; BERG *et al.*, 2021). Comparando com a literatura, estratégias terapêuticas que promovem a expansão de Tregs ou sua migração para o intestino vêm se

mostrando promissoras na contenção da DECH. Assim, os dados aqui apresentados sugerem que a fração P1G10 pode atuar nesse mesmo sentido, contribuindo para a modulação da resposta inflamatória intestinal por meio da regulação mediada por Tregs.

A análise por citometria de fluxo do intestino dos camundongos com DECH revelou que o tratamento com P1G10 promoveu uma alteração no perfil fenotípico dos macrófagos. Observou-se redução na expressão do marcador CD86<sup>+</sup>, associado ao fenótipo inflamatório M1, e aumento significativo na fluorescência média do marcador CD206<sup>+</sup>, característico do fenótipo M2, em comparação ao grupo tratado apenas com veículo. Esses dados indicam que a P1G10 induziu uma reprogramação funcional dos macrófagos intestinais, favorecendo um perfil compatível com atividade anti-inflamatória e reparadora. Na DECH intestinal, os macrófagos exercem papel central na modulação da resposta imune. Durante os estágios iniciais da doença, predomina o fenótipo M1, associado à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), que contribuem para o dano epitelial e amplificação da resposta das células T, a ativação dos macrófagos é consequência do processo inflamatório inato e perpetuação da inflamação. Os macrófagos M2 atuam na resolução da inflamação, por meio da liberação de mediadores como IL-10 e TGF- $\beta$ , além de fatores que promovem a reparação da mucosa intestinal. Evidências recentes associam o aumento de M2 à redução da gravidade clínica da DECH e à preservação da integridade tecidual (HANAKI et al., 2021; SU et al., 2022;). Nesse contexto, os resultados obtidos reforçam o potencial da P1G10 como agente modulador sobre ação em macrófagos como expõe a literatura

Com o intuito de aprofundar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na modulação intestinal observada nas análises de citometria, avaliamos as concentrações de citocinas e quimiocinas diretamente relacionadas à fisiopatologia da DECH. A análise do tecido intestinal (jejuno-fleo) revelou que o tratamento com a fração proteolítica P1G10 atenuou de forma significativa a resposta inflamatória local. Por meio da dosagem por ELISA, foi detectada uma redução expressiva nos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL2 e CCL3 nos animais tratados com P1G10, em comparação ao grupo DECH+PBS, indicando uma ação imunomoduladora relevante da fração no microambiente intestinal.

O TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos ativados, contribui para a destruição da mucosa e o aumento da permeabilidade epitelial. O IFN- $\gamma$ , secretado por células T, especialmente Th1, intensifica a ativação de macrófagos e estimula a expressão de MHC classe I e II, promovendo citotoxicidade e agravando o dano tecidual. A redução dessas citocinas após o tratamento sugere que o P1G10 interfere em vias inflamatórias cruciais, contribuindo para limitar a ativação celular exacerbada e preservar a integridade da mucosa

intestinal. Além disso, a diminuição das quimiocinas CCL2 (MCP-1) e CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) reforça esse perfil anti-inflamatório, uma vez que ambas estão envolvidas no recrutamento de células imunes para o sítio inflamatório. A CCL2 atrai monócitos e células T, enquanto a CCL3 atua sobre neutrófilos e células mieloides, exacerbando a inflamação. A supressão desses mediadores sugere que a fração P1G10 contribui para conter o acúmulo celular excessivo, favorecendo um ambiente propício à resolução do processo inflamatório (HAHN, 2008; CASTOR et al., 2012; ZHAO et al., 2014; MARKUS, 2010; MALARD, 2023).

Esses resultados estão em consonância com evidências prévias que demonstram os efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes da fração proteolítica P1G10 em diferentes modelos experimentais. Em modelo de colite aguda, P1G10 reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e da enzima COX-2 no cólon, indicando sua atuação sobre vias pró-inflamatórias clássicas. Além disso, seu potencial reparador foi evidenciado em modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos Wistar, no qual a administração subserosa de P1G10 (0,1 a 10 mg/kg) promoveu proteção significativa, atingindo uma taxa de cicatrização de até 67% com a dose de 10 mg/kg, valor comparável ao obtido com omeprazol. Ressalta-se que esse efeito foi específico, já que P1G10 não demonstrou eficácia sobre úlceras gástricas induzidas por etanol, sugerindo seletividade em seu mecanismo de ação. Adicionalmente, em modelo de melanoma murino, a fração demonstrou capacidade de inibir a angiogênese tumoral por meio da redução de VEGF e hemoglobina, evidenciando efeitos sobre componentes inflamatórios e vasculares do microambiente tecidual. Dessa forma, os achados do presente estudo, que demonstram a redução de citocinas e quimiocinas inflamatórias no intestino de animais com DECH tratados com P1G10, não apenas corroboram a literatura existente, como também expandem o escopo do seu potencial terapêutico para a modulação imunológica em doenças inflamatórias intestinais severas, como a DECH (MELLO et al., 2008; DITZ et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2020).

A última análise realizada no intestino foi a avaliação histológica, com o intuito de verificar se a fração P1G10 foi capaz de proteger as estruturas teciduais do órgão e, simultaneamente, comprovar a reprodutibilidade do modelo experimental no que tange às lesões intestinais características da DECH. Os resultados mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10, evidenciando o comprometimento morfológico do tecido intestinal e confirmando a eficácia do modelo em reproduzir os danos esperados no órgão-alvo. No entanto, a comparação entre os grupos DECH+P1G10 e DECH+PBS não demonstrou diferença significativa nas lesões histológicas, indicando que, apesar da modulação funcional e imunológica promovida pela fração, os efeitos

morfológicos ainda não são evidentes nesse período de avaliação. Isso sugere que a regeneração tecidual possa requerer maior tempo de exposição ao tratamento ou a atuação de mecanismos complementares para se tornar detectável por análise microscópica.

Após a avaliação dos efeitos da fração P1G10 no intestino órgão-alvo primário da DECH, o fígado foi analisado como segundo órgão-alvo da doença neste estudo, dada sua reconhecida relevância clínica e imunológica no contexto da DECH. O fígado, maior glândula do corpo humano, exerce funções vitais como a síntese de proteínas plasmáticas, desintoxicação e armazenamento de nutrientes. Além dessas funções metabólicas, destaca-se por sua atuação na regulação da resposta imunológica, sendo frequentemente afetado em casos de DECH. A inflamação hepática é uma manifestação comum e clinicamente significativa da doença, contribuindo diretamente para sua progressão e agravamento.

A análise imunológica do fígado por citometria de fluxo revelou alterações relevantes no perfil de células T entre os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10. Nos animais tratados com P1G10 (0,3 mg/kg), observou-se uma redução na frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$ , indicando um possível efeito anti-inflamatório da fração sobre essa população, frequentemente implicada na mediação da lesão hepática durante a DECH (HARRIS et al., 2015; CUBOS; JENNE, 2018; GOLLA et al., 2021). Paralelamente, houve um aumento na frequência total de células T CD8<sup>+</sup> nos animais que receberam P1G10; contudo, a análise da coexpressão de CD28 não mostrou diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que o aumento quantitativo dessas células não foi acompanhado por maior ativação funcional. Reforçando essa interpretação, o índice de fluorescência média (MFI) das células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  foi significativamente reduzido no grupo tratado, sugerindo uma atenuação da atividade inflamatória dessas células. Esses achados apontam para uma modulação seletiva da resposta imune hepática pelo P1G10, com redução da ativação de células T e produção de mediadores inflamatórios.

A avaliação das células Tregs no fígado revelou um aumento na intensidade média de fluorescência (MFI) da população CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> nos animais tratados com P1G10, sugerindo uma possível ativação ou aumento da expressão de marcadores relacionados à função supressora dessas células. As Tregs desempenham papel essencial na manutenção da homeostase imunológica hepática, especialmente durante processos inflamatórios, como na DECH, atuando na inibição da ativação exacerbada de células T efetoras e na proteção contra lesão tecidual. No entanto, apesar do aumento na expressão de FOXP3, não foram observadas diferenças significativas na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 entre os grupos avaliados, o que pode indicar que o efeito imunomodulador do P1G10 sobre as Tregs pode

ocorrer de forma independente da secreção desta citocina ou estar relacionado a outros mecanismos reguladores.

No que se refere à população de macrófagos residentes hepáticos, conhecidos como células de Kupffer e localizados principalmente ao longo dos sinusoides hepáticos, os dados obtidos por citometria de fluxo mostraram uma redução significativa no fenótipo inflamatório M1 (CD86+) nos animais tratados com P1G10 quando comparados ao grupo DECH+PBS. Essa modulação fenotípica sugere que a fração proteolítica é capaz de atenuar o perfil pró-inflamatório dos macrófagos também no contexto hepático. Em contextos de inflamação, como na DECH, os macrófagos do tipo M1 são amplamente associados à produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, promovendo lesão hepatocelular e disfunção do parênquima hepático. A transição desses macrófagos para um perfil menos inflamatório, como o observado com o tratamento por P1G10, pode contribuir para a redução do dano hepático e favorecer a restauração da homeostase tecidual (MYLI et al., 2020; WU et al., 2020).

Com o objetivo de complementar a análise inflamatória hepática realizamos a quantificação das citocinas inflamatórias no fígado, assim como realizada no intestino, o resultado mostra que o tratamento com P1G10 reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas envolvidas na mediação do dano tecidual na DECH. Esse resultado reforça o efeito imunomodulador da fração proteolítica e está em consonância com os achados fenotípicos obtidos por citometria de fluxo, que demonstraram a redução da população de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  no grupo tratado. No entanto, assim como observado nas análises intestinais, a avaliação histológica do fígado não evidenciou diferenças significativas na morfologia tecidual entre os grupos DECH+PBS e DECH+P1G10. Por outro lado, comparações com o grupo controle revelaram alterações estruturais compatíveis com lesão hepática nos grupos submetidos à DECH, confirmando a reprodutibilidade do modelo experimental também nesse órgão-alvo.

Compreendendo a importância do intestino como órgão-alvo central na DECH, análises adicionais foram realizadas com o intuito de avaliar, de forma direta e indireta, a integridade da barreira intestinal e as consequências sistêmicas de sua disfunção. A camada de muco intestinal, composta principalmente por mucinas secretadas pelas células caliciformes, constitui a primeira linha de defesa contra microrganismos luminiais, sendo essencial para a manutenção da homeostase da mucosa (STOCKINGER; XÁ; WICENT, 2021). Na DECH, o dano epitelial compromete estruturas como os complexos juncionais, responsáveis pela coesão e seletividade da barreira, facilitando a translocação bacteriana para outros compartimentos do organismo (LANGREHR et al., 2000; ERIGUCHI et al., 2012). Esse processo, frequentemente observado

em modelos experimentais da doença, contribui para a ativação exacerbada do sistema imune por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), agravando a inflamação sistêmica e a lesão tecidual (COOKE et al., 2002; DANDER et al., 2023). Para aprofundar a compreensão desses mecanismos no presente estudo, a análise da integridade da barreira intestinal foi realizada por meio da quantificação de células caliciformes no cólon, enquanto a ocorrência de translocação bacteriana foi investigada através do plaqueamento microbiológico de amostras de fígado, lavado peritoneal e sangue dos grupos DECH+PBS e DECH+P1G10.

A análise histoquímica com PAS revelou uma preservação significativamente maior das células caliciformes no cólon dos animais tratados com a fração proteolítica P1G10 em comparação ao grupo DECH+PBS. Também foi observado um encurtamento colônico nos animais não tratados, achado compatível com processos inflamatórios intestinais descritos na literatura, como na colite (IACCARINO et al., 2019). Esses dados indicam que a P1G10 exerce um efeito protetor sobre a integridade do cólon, possivelmente mediado por sua ação anti-inflamatória. Resultados semelhantes foram reportados em modelo de colite induzida por TNBS, no qual o tratamento com P1G10 reduziu em 80% o dano macroscópico ( $p < 0,05$ ) e aumentou em 140% a densidade de células caliciformes ( $p < 0,01$ ) (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Dando sequência à avaliação da integridade intestinal, os testes de translocação bacteriana reforçaram o efeito protetor do tratamento com P1G10. Enquanto os animais com DECH tratados com a fração (0,3 mg/kg) não apresentaram bactérias no lavado peritoneal e sangue, o grupo DECH+PBS demonstrou translocação significativa, com detecção de micro-organismos no lavado, fígado e sangue. Além disso, a presença bacteriana no fígado foi menor nos animais tratados com P1G10. A análise hematológica corroborou esses achados, evidenciando neutrofilia acentuada e presença de bactérias Gram-positivas no sangue dos animais não tratados, em contraste com os tratados. Esses resultados indicam que o P1G10 contribuiu para a preservação da barreira intestinal. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para elucidar os mecanismos pelos quais a P1G10 preserva a integridade da barreira intestinal, bem como investigar a possibilidade de uma ação antimicrobiana direta ou indireta. Até o momento, a literatura carece de trabalhos que explorem essa linha de pesquisa, destacando a importância de investigações futuras para compreender plenamente o potencial terapêutico da P1G10 nesse contexto. A translocação de bactérias intestinais e seus metabólitos para a corrente sanguínea pode proporcionar maior ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) do hospedeiro através dos danos associados a patógenos (PAMPs) que

interagem com TLRs para ativar e amadurecer APCs, subsequentemente ativar células T do doador com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e, eventualmente, induzir DECH. Estudos atuais mostram que essa disfunção pode alterar a composição da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de microrganismos patogênicos, agravando o quadro inflamatório associado a doença (COOKE et al., 2002; TU et al., 2016; SWIMM et al., 2018; LIN et al., 2021; RAFAEI et al., 2021).

Torna-se relevante destacar que os primeiros experimentos foram conduzidos com a administração intraperitoneal de P1G10 em animais com DECH. No entanto, essa via não resultou em melhora clínica ou aumento da sobrevivência, o que contrastou com os efeitos observados na administração oral. A partir disso, passou-se a utilizar a via oral, que demonstrou eficácia na proteção da barreira intestinal, redução da translocação bacteriana. Esses resultados sugerem que a ação terapêutica da P1G10 em nosso modelo experimental de DECH é dependente da via de administração oral, possivelmente devido a interações locais com o epitélio intestinal ou com a microbiota.

Com o objetivo de investigar se a translocação bacteriana poderia estar associada a uma intensificação da inflamação sistêmica, realizamos a quantificação de citocinas no soro de animais do grupo DECH+PBS, que apresentaram translocação evidente e comparamos com os animais tratados com P1G10. Os resultados revelaram uma redução significativa nos níveis séricos de IFN- $\gamma$  nos animais tratados com a fração proteolítica. Essa citocina exerce papel central na patogênese da DECH ao promover a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e estimular a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o agravamento do dano tecidual. Além disso, em situações de sepse, o IFN- $\gamma$  está envolvido na amplificação da inflamação sistêmica, favorecendo disfunções orgânicas múltiplas (NOTH et al., 2011; ZHAO et al., 2014; WANG; YANG, 2014). Também foi observada uma redução significativa nos níveis das quimiocinas CCL2 e CCL3 no grupo tratado. A CCL2 é responsável pelo recrutamento de monócitos e macrófagos aos locais de inflamação, células que, uma vez ativadas, podem amplificar a resposta inflamatória na DECH. A CCL3, por sua vez, participa da ativação e migração de diversas células imunes, atuando na intensificação do processo inflamatório. A diminuição dessas moléculas no soro dos animais tratados com P1G10 sugere que o composto foi capaz de modular a inflamação sistêmica, provavelmente como consequência da manutenção da integridade da barreira intestinal e da prevenção da translocação bacteriana (TRIFILO et al., 2003; MILKLOS et al., 2009; CASTOR; PINHO; TEIXEIRA, 2012; REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015).

A análise da translocação bacteriana demonstrou que o tratamento com P1G10 foi capaz de impedir a migração de microrganismos do intestino para órgãos periféricos e circulação sistêmica, reforçando sua ação protetora sobre a barreira intestinal. Para aprofundar essa observação e verificar diretamente a integridade da mucosa intestinal, realizamos a avaliação da permeabilidade utilizando o teste do Azul de Evans. Esse marcador permite mensurar o grau de extravasamento de macromoléculas, sendo um indicativo direto do comprometimento da barreira epitelial. De forma consistente com os achados anteriores, os animais do grupo DECH+PBS apresentaram menores concentrações de Azul de Evans retido no intestino em comparação ao grupo controle, indicando aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, esses mesmos animais mostraram maiores concentrações do corante no fígado e no soro quando comparados ao grupo DECH+P1G10, o que reforça a eficácia da fração proteolítica em preservar a integridade da barreira epitelial.

Por fim, conduzimos um experimento para avaliar se a P1G10 poderia interferir no efeito enxerto-contraleucemia (ECL). O ECL representa um importante benefício do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, sendo caracterizado pela capacidade das células do enxerto de reconhecer e eliminar células tumorais residuais no hospedeiro. No entanto, a mesma ativação imunológica que desencadeia o ECL também pode promover a DECH (CASSADY; MARTIN; ZENG, 2018; TESHIMA; HASHIMOTO, 2023). Dessa forma, o grande desafio no contexto do transplante é desenvolver abordagens terapêuticas capazes de prevenir ou controlar a DECH sem comprometer o ECL. Fármacos com esse potencial são altamente desejáveis, pois conciliam a eficácia antitumoral com a redução da toxicidade imunológica, representando um avanço significativo no manejo pós-transplante.

Os resultados indicaram que o tratamento com P1G10 não interferiu nesse processo, uma vez que não houve alterações significativas no enxerto-contraleucemia, quando o experimento foi realizado com células de mastocitoma ao comparar os grupos Tumor+transplante singênico, DECH, Tumor+DECH+PBS, Tumor+DECH+P1G10. Foi constatado ainda um achado relevante, evidenciado pela diminuição das células tumorais nos linfonodos dos animais do grupo TUMOR+P1G10 0,3 mg/kg, quando comparado ao grupo TUMOR+transplante singênico. Esse resultado corrobora achados de outros modelos experimentais que evidenciam o efeito antitumoral da fração P1G10. Esse resultado está alinhado com estudos anteriores que demonstram o potencial antitumoral da P1G10. Em modelos murinos de melanoma B16F1, por exemplo, a fração inibiu a angiogênese, reduziu os níveis de hemoglobina e VEGF intratumorais, promoveu apoptose celular e diminuiu a adesão celular à matriz extracelular, sem comprometer a viabilidade das células. De forma semelhante,

em melanoma metastático B16-F10, a fração promoveu redução da massa tumoral, aumento da fragmentação de DNA e menor adesão celular reforçando seu efeito antitumoral (MELLO et al., 2006; DITZ et al., 2015).

Apesar das limitações inerentes aos modelos experimentais de indução da DECH, os resultados obtidos neste estudo evidenciam, de forma consistente e robusta, o potencial terapêutico da fração proteolítica P1G10 no manejo dessa condição. A análise imunofenotípica por citometria de fluxo revelou que o tratamento com P1G10 foi capaz de modular significativamente o perfil imunológico dos animais com DECH. Observou-se uma diminuição na ativação de células T nos órgãos-alvo (intestino, fígado), além da redução na produção de citocinas inflamatórias por essas células. Em casos específicos, houve ainda um aumento na ativação de células T regulatórias, sugerindo um papel imunomodulador ativo da fração. Além disso, a P1G10 induziu alterações fenotípicas em macrófagos, reduzindo a proporção de células com perfil inflamatório M1 e promovendo um aumento do fenótipo anti-inflamatório M2.

Complementando esses achados, a análise dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias revelou reduções significativas nos níveis de TNF, IFN- $\gamma$ , CCL2 e CCL3 nos animais tratados com P1G10. Essas moléculas desempenham papéis centrais no recrutamento e ativação de células do sistema imune, amplificando a inflamação sistêmica característica da DECH, especialmente nos tecidos do trato gastrointestinal e hepático. A diminuição desses mediadores reforça o efeito anti-inflamatório sistêmico da fração.

Do ponto de vista da integridade da barreira intestinal, a P1G10 demonstrou efeitos protetores notáveis. A ausência de bactérias viáveis no lavado peritoneal, fígado e sangue dos animais tratados indica uma contenção eficaz da translocação bacteriana. Esse resultado foi sustentado por três evidências principais: (I) manutenção da permeabilidade epitelial, confirmada pelo maior acúmulo de Azul de Evans no intestino dos animais tratados, em contraste com a maior concentração do corante no fígado e soro dos animais não tratados; (II) preservação das células caliciformes no cólon, indicativa de menor agressão ao epitélio intestinal; e (III) efetiva prevenção da translocação bacteriana, sugerindo integridade funcional da barreira mucosa.

Ao avaliarmos se a P1G10 interferiria na resposta do ECL, observamos que o tratamento não comprometeu essa resposta imunológica benéfica. Os grupos com tumor submetidos ao transplante alogênico apresentaram redução tumoral compatível com a manutenção do ECL, mesmo após o tratamento com a fração. Ademais, um achado adicional relevante foi a redução de células tumorais nos linfonodos de animais do grupo Tumor+P1G10, quando comparados

ao grupo Tumor+transplante singênico, sugerindo um efeito antitumoral direto da fração, alinhado a dados prévios da literatura em modelos de melanoma murino.

Destarte, os achados obtidos com a fração P1G10, somados aos dados experimentais e clínicos já descritos na literatura, reforçam seu potencial como uma abordagem terapêutica translacional promissora no contexto da DECH, especialmente no controle da resposta inflamatória exacerbada. Ainda assim, são necessários estudos adicionais para elucidar completamente seus mecanismos de ação e consolidar sua aplicabilidade clínica, ampliando as possibilidades de uso dessa biomolécula em cenários terapêuticos mais amplos.

## 7. CONCLUSÃO

Nosso modelo experimental busca mimetizar os efeitos da DECH por meio da indução em camundongos, permitindo a avaliação da resposta inflamatória e de possíveis intervenções terapêuticas. Nesse contexto investigamos a ação da fração proteolítica P1G10, extraída do mamão *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre parâmetros inflamatórios da doença.

Os resultados apresentados confirmam a hipótese inicial de que a P1G10 pode atuar como um modulador da resposta anti-inflamatória na DECH. No entanto, torna-se fulcral a realização de estudos subsequentes para elucidar os mecanismos envolvidos nesse efeito, em especial no contexto intestinal, aparentemente órgão determinante na sua eficácia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R. M.; PIZZITOLA, M. P.; ARAÚJO, E. S. A. C.; DITZ, D. et al. **The Proteolytic Fraction From *Vasconcellea cundinamarcensis* Latex Displays Anti-Inflammatory Effect in A Mouse Model of Acute TNBS-Induced Colitis.** *Sci Rep*, 10, n. 1, p. 3074, Feb 20 2020.

ALI, N. e colab. **Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2 $\gamma$ null mice display a T-effector memory phenotype.** *PLoS ONE*. 2012,

APOSTOLOVA, P.; ZEISER, R. **The Role of Purine Metabolites as DAMPs in Acute Graft-versus-Host Disease.** *Front Immunol*, 7, p. 439, 2016.

ARA, T. e colab. **Intestinal goblet cells protect against GVHD after allogeneic stem cell transplantation via Lypd8.** *Sci Transl Med*. 2020.

ARAUJO E SILVA, A. C.; DE OLIVEIRA LEMOS, F.; GOMES, M. T.; SALAS, C. E. *et al.* **Role of gastric acid inhibition, prostaglandins and endogenous-free thiol groups on the gastroprotective effect of a proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex.** *J Pharm Pharmacol*, 67, n. 1, p. 133-141, Jan 2015.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. **Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 51, n. 1, p. 1-9, 1990.

BARNES, D. W.; LOUTIT, J. F. **Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II.** *Br J Haematol*, 3, n. 3, p. 241-252, Jul 1957..

BAUMRIN, E.; LOREN, A. W.; FALK, S. J.; MAYS, J. W. *et al.* **Chronic graft-versus-host disease. Part I: Epidemiology, pathogenesis, and clinical manifestations.** *J Am Acad Dermatol*, 90, n. 1, p. 1-16, Jan 2024.

BAZINET, A; POPRADI, G. **A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation.** *Current Oncology*, v.26, n.3, p. 187-191, 2021

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. E. **A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*.** *Braz J Med Biol Res*, 27, n. 12, p. 2831-2842, Dec 1994.

BERG, B. B.; LINHARES, A. F. S.; MARTINS, D. M.; RACHID, M. A. *et al.* **Anandamide reduces the migration of lymphocytes to the intestine by CB2 activation and reduces TNF- $\alpha$  in the target organs, protecting mice from graft-versus-host disease.** *Eur J Pharmacol*, 956, p. 175932, Oct 5 2023.

BERG, B. B.; SOARES, J. S.; PAIVA, I. R.; REZENDE, B. M. *et al.* **Cannabidiol Enhances Intestinal Cannabinoid Receptor Type 2 Receptor Expression and Activation Increasing Regulatory T Cells and Reduces Murine Acute Graft-versus-Host Disease without Interfering with the Graft-versus-Leukemia Response.** *J Pharmacol Exp Ther*, 377, n. 2, p. 273-283, May 2021.

BERNARDO, M. E.; AIUTI, A. **The Role of Conditioning in Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy.** *Hum Gene Ther*, 27, n. 10, p. 741-748, Oct 2016.

BEVANS, Margaret et al. **National Institutes of Health hematopoietic cell transplantation late effects initiative: the patient-centered outcomes working group report.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 23, n. 4, p. 538-551, 2017.

BILHEIRO, R. P.; BRAGA, A. D.; FILHO, M. L.; CARVALHO-TAVARES, J. *et al.* **The thrombolytic action of a proteolytic fraction (PIG10) from *Carica candamarcensis*.** *Thromb Res*, 131, n. 4, p. e175-182, Apr 2013.

Bottega, Roberta et al. **Anti-inflammatory properties of a proprietary bromelain extract (Bromeyal™) after in vitro simulated gastrointestinal digestion.** *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2021,

BRYSON, J. S. et al. **Induction of a syngeneic graft-versus-host disease-like syndrome in DBA/2 mice.** *Transplantation*, v. 48, n. 6, p. 1042-1047, 1989.

CASTOR, Marina et al. **The CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice.** *J Immunol.*, v.184, n.5, p.2646-2654, 2010.

CASTOR, M. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. **The role of chemokines in mediating graft versus host disease: opportunities for novel therapeutics.** *Front Pharmacol*, 3, p. 23, 2012.

CASTOR, Marina et al. **PI3K $\gamma$  controls leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality in a model of graft-versus-host disease in mice.** *J Leukoc Biol.*, v.89, n.6, p.955-964, 2011.

CHEN, X.; SUN, H.; CASSADY, K.; YANG, S. *et al.* **The Addition of Sirolimus to GVHD Prophylaxis After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Meta-Analysis of Efficacy and Safety.** *Front Oncol*, 11, p. 683263, 2021.

CHOW, Eric J. et al. **Late effects surveillance recommendations among survivors of childhood hematopoietic cell transplantation: a Children's Oncology Group report.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 22, n. 5, p. 782-795, 2016.

COLOMBO, Anna Amelia et al. **Neurological Complications Involving the Central Nervous System After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation During a Period of Evolution in Transplant Modalities: A Cohort Analysis.** *Transplantation*, v.101, n.3, p.616-623, 2017.

COX, G. J.; MATSUI, S. M.; LO, R. S.; HINDS, M. *et al.* **Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study.** *Gastroenterology*, 107, n. 5, p. 1398-1407, Nov 1994.

CURTIS, M. J. e colab. **Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers.** *Br J Pharmacol*. 2018.

DE NIZ, Mariana; NACER, Adéla; FRISCHKNECHT, Friedrich. **Intravital microscopy: imaging host–parasite interactions in the brain.** Cellular microbiology, v. 21, n. 5, p. e13024, 2019.

DENADAI, A. M.; SANTORO, M. M.; LOPES, M. T.; CHENNA, A. *et al.* **A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity: physicochemical characterization.** BioDrugs, 20, n. 5, p. 283-291, 2006.

DEN HAAN, J. M.; KRAAL, G. **Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen.** J Innate Immun, 4, n. 5-6, p. 437-445, 2012.

DENNINGER, Jiyeon K.; SMITH, Bryon M.; KIRBY, Elizabeth D. **Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget.** J Vis Exp. v.141, p.1-20, 2018.

DIGNAN, Fiona L.; CLARK, Andrew; AMRÓLIA, Persis; CORNISH, Jacqueline; JACKSON, Graham; MAHENDRA, Prem; SCARISBRICK, Julia J.; TAYLOR, Peter C.; HADZIC, Nedim; SHAW, Bronwen E.; POTTER, Michael N. **Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease.** British journal of haematology, v.158, n.1, p. 30-45, 2012.

DIGNAN, F. L.; CLARK, A.; AMROLIA, P.; CORNISH, J. *et al.* **Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease.** Br J Haematol, 158, n. 1, p. 30-45, Jul 2012.

DITZ, D.; FIGUEIREDO, C.; LEMOS, F. O.; VIANA, C. T. *et al.* **Antiangiogenesis, loss of cell adhesion and apoptosis are involved in the antitumoral activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in murine melanoma B16F1.** Int J Mol Sci, 16, n. 4, p. 7027-7044, Mar 27 2015.

DOWLING, MR; LI, S; DEY, BR; MCAFEE, SL; HOCK, HR; SPITZER, TR; CHEN, Y-B; BALLEEN, KK. **Neurologic complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors and impact.** Bone Marrow Transplant., v.53, n.2, p.199-206, 2018.

DOU, L.; SHI, X.; HE, X.; GAO, Y. **Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder.** Front Immunol, 10, p. 3112, 2019.

DUARTE, R. F.; LABOPIN, M.; BADER, P.; BASAK, G. W. *et al.* **Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019.** Bone Marrow Transplant, 54, n. 10, p. 1525-1552, Oct 2019.

EITELVEN, Tatiane *et al.* **Aplicações Biológicas de Células-tronco: Benefícios e Restrições.**

Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada, Caxias do Sul, v. 2, n. 3, p. 13-20, 2017.

ELLWARDT, Erik *et al.* **Understanding the role of T cells in CNS homeostasis.** Trends in immunology, v. 37, n. 2, p. 154-165, 2016.

ELHAGE, Amal; SLIGAR, Chloe; CUTHBERTSON, Peter; WATSON, Debbie; SLUYTER,

Ronald. **Insights into mechanisms of graft-versus-host disease through humanised mouse models.** Bioscience reports, v. 42, n. 9, p. BSR20211986, 2022.

FERRARA, James LM; LEVINE, JE; REDDY, P; HOLLER, E. **Graft-versus-host disease.** The Lancet, v.373, n.9674, p.1550-1561, 2009.

FERRARA, J. L. M.; CHAUDHRY, M. S. **GVHD: biology matters.** Blood Adv, 2, n. 22, p. 3411-3417, Nov 27 2018.

FERREIRA JLM, LEVINE JE, REDDY P, HOLLER E. Graft-versus-host disease. **The Lancet.** v. 373, p.1550-1561, 1985.

FILIPOVICH, Alexandra H. et al. **National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report.** Biology of blood and marrow transplantation, v.11, n.12, p. 945-956, 2005.

FREITAS, K. M.; BARCELOS, L. S.; CALIARI, M. V.; SALAS, C. E. *et al.* **Healing activity of proteolytic fraction (P1G10) from Vasconcellea cundinamarcensis in a cutaneous wound excision model.** Biomed Pharmacother, 96, p. 269-278, Dec 2017.

FREITAS, K. M.; SILVA, A.; VELOSO, E. S.; FERREIRA, Ê. *et al.* **P1G10, the Proteolytic Fraction from Vasconcellea cundinamarcensis, Stimulates Tissue Repair after Acute Exposure to Ultraviolet B Radiation.** Int J Mol Sci, 20, n. 18, Sep 6 2019.

FREITAS, K. M.; VELOSO, E. S, FERREIRA Ê, CALIARI, M, V. *et al.* **Effects of P1G10 against UVB-induced damage: Reduction of antioxidant stress, inflammation and cell proliferation.** Journal of Photochemistry and Photobiology, V. 25, 2025.

FUKUMOTO, Risaku; CARY, Lynnette H.; GORBUNOV, Nikolai V.; LOMBARDINI, Eric D.; ELLIOTT, Thomas B.; KIANG, Juliann G. **Ciprofloxacin Modulates Cytokine/Chemokine Profile in Serum, Improves Bone Marrow Repopulation, and Limits Apoptosis and Autophagy in Ileum after Whole Body Ionizing Irradiation Combined with Skin-Wound Trauma.** PLoS One, v.8, n.3, e58389, 2013.

GALE, R. P. e colab. **Risk factors for acute graft-versus-host disease.** Br. J. Haematol. 1987,

GAUTHIER, Jordan; VERMERSCH, Patrick; CHAUVET, Paul; VARLET, Pauline; COITEUX, Valérie; MAGRO, Leonardo; YAKOUB-AGHA, Ibrahim. **Successful treatment with fingolimod of graft-versus-host disease of the central nervous system.** Blood Adv. v.2, n.1, p.10-13, 2018.

GHIMIRE, Sakhila et al. **Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications.** Frontiers in immunology, v.8, p.79, 2017.

GRAMEGNA, D.; BERTOLI, D.; CATTANEO, C.; ALMICI, C. *et al.* **The role of clonal hematopoiesis as driver of therapy-related myeloid neoplasms after autologous stem cell transplantation.** Ann Hematol, 101, n. 6, p. 1227-1237, Jun 2022.

GOLA, A.; DORRINGTON, M. G.; SPERANZA, E.; SALA, C. *et al.* **Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence.** *Nature*, 589, n. 7840, p. 131-136, Jan 2021.

GOMES, F. S.; SPÍNOLA CDE, V.; RIBEIRO, H. A.; LOPES, M. T. *et al.* **Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn.** *Burns*, 36, n. 2, p. 277-283, Mar 2010.

GOMES, M.T.R.; MELLO, V.J.; RODRIGUES, K.C.; BEMQUERER, M.P.; LOPES, M.T.P.; FAÇA, V.M.; SALAS, C.E. **Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells.** *Planta Med.*, v.71, n.3, p.244-248, Mar. 2005.

GOMES, M.T.; TEIXEIRA, R.D.; RIBEIRO, H.A.; TURCHETTI, A.P.; JUNQUEIRA, C.F.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E.; NAGEM, R.A. **Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2: a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* latex.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, v.64, n.6, p.492-494, Jun. 2008.

GYURKOCZA, B. *et al.*, **Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art.** *Expert Review of Hematology*, 2010.

GYURKOCZA, Boglarka; SANDMAIER, Brenda M. **Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all.** *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v.124, n.3, p. 344-353, 2014.

HANAKI R, Toyoda H, Iwamoto S, Morimoto M, Nakato D, Ito T, Niwa K, Amano K, Hashizume R, Tawara I, Hirayama M. **Donor-derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Immun Inflamm Dis.* n. 9 p.1489-1499, Dec, 2021

HAN, X.; NIEMAN, M. T.; KERLIN, B. A. **Protease-activated receptors: An illustrated review.** *Res Pract Thromb Haemost*, 5, n. 1, p. 17-26, Jan 2021.

HAHN, T. *et al.* **Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia.** *J. Clin. Oncol.* 2008

HARA, M.; CHOSA, E.; ONITSUKA, T. **The spleen's role in transplantation immunology.** *Transpl Immunol*, 18, n. 4, p. 324-329, Feb 2008.

HARRIS, A. C.; YOUNG, R.; DEVINE, S.; HOGAN, W. J. *et al.* **International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium.** *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, n. 1, p. 4-10, Jan 2016.

HASEGAWA, Y.; HASHIMOTO, D.; ZHANG, Z.; MIYAJIMA, T. *et al.* **GVHD targets organoid-forming bile duct stem cells in a TGF- $\beta$ -dependent manner.** *Blood*, 144, n. 8, p. 904-913, Aug 22 2024.

HASHIMOTO, S.; HONDA, M.; TAKEICHI, T.; SAKISAKA, M. *et al.* **Intravital imaging of neutrophil recruitment in intestinal ischemia-reperfusion injury.** *Biochem Biophys Res Commun*, 495, n. 3, p. 2296-2302, Jan 15 2018.

HASHIMOTO, K.; KAITO, T.; KIKUTA, J.; ISHII, M. **Intravital imaging of orthotopic and ectopic bone.** *Inflamm Regen*, 40, n. 1, p. 26, Nov 2 2020.

HENDEN, Andrea S.; HILL, Geoffrey R. **Cytokines in graft-versus-host disease.** *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 10, p. 4604-4612, 2015.

HEUBERGER, D. M.; SCHUEPBACH, R. A. **Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases.** *Thromb J*, 17, p. 4, 2019.

HINTIRYAN, Hourii *et al.* **The mouse cortico-striatal projectome.** *Nature neuroscience*, v. 19, n. 8, p. 1100-1114, 2016.

HONDA, M.; KADOHISA, M.; YOSHII, D.; KOMOHARA, Y. *et al.* **Intravital imaging of immune responses in intestinal inflammation.** *Inflamm Regen*, 43, n. 1, p. 9, Feb 3 2023.

HONG, Chao; JIN, Rong; DAI, Xiaoqiu; GAO, Xiaoming. **Functional Contributions of Antigen Presenting Cells in Chronic Graft-Versus-Host Disease.** *Front Immunol*. v.12, n. 6141832021, 2021.

HOROWITZ, A.; CHANEZ-PAREDES, S. D.; HAEST, X.; TURNER, J. R. **Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20, n. 7, p. 417-432, Jul 2023.

HUANG, X.; LI, Y.; FU, M.; XIN, H. B. **Polarizing Macrophages In Vitro.** *Methods Mol Biol*, 1784, p. 119-126, 2018.

IACCARINO, N.; AMATO, J.; PAGANO, B.; DI PORZIO, A. *et al.* **Impact of phytosterols on liver and distal colon metabolome in experimental murine colitis model: an explorative study.** *J Enzyme Inhib Med Chem*, 34, n. 1, p. 1041-1050, Dec 2019.

ITABASHI, Yoshihiro *et al.* **Role for exosomes with self-antigens and immune regulatory molecules in allo-and auto-immunity leading to chronic immune injury following murine kidney transplantation.** *Transplant Immunology*, v. 75, p. 101702, 2022.

ITO, Ryoji *et al.* **Exacerbation of pathogenic Th17-cell-mediated cutaneous graft-versus-host- disease in human IL-1 $\beta$  and IL-23 transgenic humanized mice.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 516, n. 2, p. 480-485, 2019.

JAKSCH, M.; MATTSSON, J. **The pathophysiology of acute graft-versus-host disease.** *Scand J Immunol*, 61, n. 5, p. 398-409, May 2005.

JAMY, O.; ZEISER, R.; CHEN, Y. B. Novel developments in the prophylaxis and treatment of acute GVHD. **Blood**, 142, n. 12, p. 1037-1046, Sep 21 2023.

KALIYAPERUMAL, Saravanan; WATKINS, Benjamin; SHARMA, Prachi; FURLAN, Scott; RAMAKRISHNAN, Swetha; GIVER, Cynthia; GARCIA, Anapatricia; COURTNEY, Cynthia; KNIGHT, Heather; STROBERT, Elizabeth; ELDER, Eric; CRENSHAW, Timothy;. BLAZAR, Bruce R; WALLER, Edmund K; WESTMORELAND, Susan; KEANAUTOR, Leslie S. **CD8-predominant T-cell CNS infiltration accompanies GVHD in primates and is improved with immunoprophylaxis.** Blood. v.123, n.12, p. 1967-1969, 2014.

KERBAUY, Fábio Rodrigues; RIBEIRO, Andreza Alice Feitosa. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. In: HAMERSCHLAK, Nelson. **Manual de hematologia: Programa Integrado de Hematologia e Transplante de Medula Óssea.** Barueri: Manole, 2011. cap. 38, p. 299-303.

KING, M. e colab. **A new hu-PBL model for the study of human isle colobloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene.** Clinical Immunology. 2008.

KYNDT, T.; ROMEIJN-PEETERS, E.; VAN DROOGENBROECK, B.; ROMEROMOTOCHI, J. P. *et al.* **Species relationships in the genus Vasconcellea (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence.** Am J Bot, 92, n. 6, p. 1033-1044, Jun 2005.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; KOUROUMALIS, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. **World J Gastroenterol**, 12, n. 46, p. 7413-7420, Dec 14 2006.

KOSTER, Eva AS *et al.* **Competitive repopulation and allo-immunological pressure determine chimerism kinetics after T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions.** Transplantation and Cellular Therapy, 2023.

KRAEUTER, Ann-Katrin; GUEST, Paul C.; SARNYAI, Zoltán. **The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice.** In: Pre-clinical models. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 105-111.

KUBA, Adam; RAIDÁ, Ludek. **Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence.** Mediators of Inflammation, Olomouc, v. 18, p. 1-13, 2018.

KUBES, P.; JENNE, C. **Immune Responses in the Liver.** Annu Rev Immunol, 36, p. 247-277, Apr 26 2018.

LABRADOR, J.; LÓPEZ-CORRAL, L.; VAZQUEZ, L.; SÁNCHEZ-GUIJO, F. *et al.* **Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogeneic stem cell transplant.** Br J Haematol, 169, n. 5, p. 719-725, Jun 2015.

LACHANCE, S.; GOMES, M. M.; BAMBACE, N. M.; BITTENCOURT, H. *et al.* **Recognition of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy Expertise to Promote Care Accessibility: A Formally Credentialed Area of Focused Competence in Canada.** Transplant Cell Ther, 27, n. 9, p. 702-706, Sep 2021.

LANGREHR, J. M.; MACHENS, C.; ZILL, E.; LEDER, K. *et al.* **Bacterial translocation during graft-versus-host disease after small bowel transplantation is reduced following**

**inhibition of inducible nitric oxide synthesis.** *Transplantation*, 69, n. 11, p. 2415-2421, Jun 15 2000.

LEMOS, F.O.; SALAS, C.E.; CARDOSO, V.N.; LOPES, M.T.P. **Parâmetros farmacocinéticos da fração cromatográfica proteolítica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis* com atividades farmacológicas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA, 40, 2008, Águas de Lindóia.

LEMOS, F. O.; DITZ, D.; SANTOS, V. G.; PIRES, S. F. *et al.* **Cysteine Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) Inhibit Melanoma Metastasis and Modulate Expression of Proteins Related to Proliferation, Migration and Differentiation.** *Int J Mol Sci*, 19, n. 10, Sep 20 2018.

LEMOS, Fernanda O. *et al.* **Biodistribuição, farmacocinética e toxicidade de uma fração de proteinase de *Vasconcellea cundinamarcensis* com atividade farmacológica.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 1, p. 94-101, 2016.

LI, Alicia; ABRAHAM, Ciril; WANG, Ying; ZHANG, Yi. **New insights into the basic biology of acute graft-versus-host-disease.** *Haematologica.*, v.105, n.11, p.2540-2549, 2020.

LI, J. e colab. **Roles of CD28, CTLA4, and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2011.

LI, K.; RUAN, G.; LIU, S.; XU, T. *et al.* **Eosinophilic gastroenteritis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment.** *Chin Med J (Engl)*, 136, n. 8, p. 899-909, Apr 20 2023.

LIANG, L.; ZHANG, J.; CHEN, J.; TIAN, Y. *et al.* **Bazedoxifene attenuates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice through gut microbiota modulation and inhibition of STAT3 and NF- $\kappa$ B pathways.** *Eur J Pharmacol*, 974, p. 176611, Jul 5 2024.

LIN, D.; HU, B.; LI, P.; ZHAO, Y. *et al.* **Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD.** *Exp Hematol Oncol*, 10, n. 1, p. 49, Oct 27 2021.

LIN JH. **Dose-dependent pharmacokinetics: experimental observations and theoretical considerations.** *Biopharm Drug Dispos*, 10, n. 5. P. 31, Jan 1994.

LUFT, T. e colab. **Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease.** *Blood*. 2007.

MAAS-BAUER, K.; STELL, A. V.; YAN, K. L.; DE VEGA, E. *et al.* **ROCK1/2 signaling contributes to corticosteroid-refractory acute graft-versus-host disease.** *Nat Commun*, 15, n. 1, p. 446, Jan 10 2024.

MALARD, F. e colab. **Acute graft-versus-host disease.** *Nat Rev Dis Primers*. 2023.

MARDANI, Masoud; ABOLGHASEMI, Sara; SHABANI, Shiva; TAVAKOLI, Farzaneh ; SAEEDI, Anahita; PARKHIDEH, Sayeh; HAJIFATHALI, Abbas. **The association of conditioning regimen with cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Iran J Microbiol.*, v.12, n.6, p.636-643, 2020.

MARKUS, M. H. e colab. **MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease.** Gut. 2010.

MARTINEZ-CIBRIAN, Nuria; ZEISER, Robert; PEREZ-SIMON, Jose A. **Graft-versus-host disease prophylaxis: Pathophysiology-based review on current approaches and future directions.** Blood reviews, v.48, 100792, 2021.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T.; LEMOS, F. O.; DELFINO, J. L. *et al.* **The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*.** Phytomedicine, 15, n. 4, p. 237-244, Apr 2008.

MORENO, David F.; CID, Joan. **Enfermedad del injerto contra el receptor.** Med. Clin., v.152, n.1, p.22-28, 2019.

MURARO, P. A.; MARTIN, R.; MANCARDI, G. L.; NICHOLAS, R. *et al.* **Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis.** Nat Rev Neurol, 13, n. 7, p. 391-405, Jul 2017.

N, A. G.; CASTRILLO, A. **Origin and specialization of splenic macrophages.** Cell Immunol, 330, p. 151-158, Aug 2018.

NAYMAGON, S.; NAYMAGON, L.; WONG, S. Y.; KO, H. M. *et al.* **Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 14, n. 12, p. 711-726, Dec 2017.

NING, P.; LIU, Y.; KANG, J.; CAO, H. *et al.* **Comparison of healing effectiveness of different debridement approaches for diabetic foot ulcers: a network meta-analysis of randomized controlled trials.** Front Public Health, 11, p. 1271706, 2023.

NOTH, R. e colab. **Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model.** BMC Gastroenterol. 2011,

PERINI, G. F.; KERBAUY, F. R.; FERNANDES, J. F.; SANTOS, F. P. *et al.* **Haploidentical non-myeloablative stem cell transplantation as salvage for graft failure in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia.** Pediatr Blood Cancer, 57, n. 6, p. 1084, Dec 1 2011.

PEREIRA, Amanda Claro dos Santos Nunes et al. **Nutritional status and prognosis in children with immunodeficiencies undergoing hematopoietic stem cell transplantation.** Clinical Nutrition ESPEN, v. 52, p. 1-11, 2022.

POPP, Raymond A. **Repopulation of thymus by immunologically competent cells derived from donor marrow.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 108, n. 3, p. 561-564, 1961.

RAFEI, H.; JENQ, R. R. **Microbiome-intestine cross talk during acute graft-versus-host disease.** Blood, 136, n. 4, p. 401-409, Jul 23 2020.

RAMACHANDRAN, Vignesh; KOLLI, Sree S.; STROWD, Lindsay C. Review of graft-versus-host disease. Dermatologic Clinics, v.37, n.4, p. 569-582, 2019.

RAMADAN, A.; PACZESNY, S. **Various Forms of Tissue Damage and Danger Signals Following Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.** *Frontiers in Immunology*. 2015.

RHEE, J. W.; PILLAI, R.; HE, T.; BOSWORTH, A. *et al.* **Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease in Patients With Multiple Myeloma Undergoing Hematopoietic Cell Transplant.** *JAMA Cardiol*, 9, n. 1, p. 16-24, Jan 1 2024.

REZENDE, Barbara M; BERNARDES, Priscila T T; RESENDE, Carolina B; ARANTES, Rosa M E; SOUZA, Danielle G; BRAGA, Fernão C; CASTOR, Marina G M; TEIXEIRA, Mauro M; Pinho, Vanessa. **Lithothamnion muelleri controls inflammatory responses, target organ injury and lethality associated with graft-versus-host disease in mice.** *Mar Drugs.*, v.11, n.7, p.2595-2615, 2013.

RUUTU, T.; GRATWOHL, A.; DE WITTE, T.; AFANASYEV, B. *et al.* **Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice.** *Bone Marrow Transplant*, 49, n. 2, p. 168-173, Feb 2014.

SAGAR, Divya *et al.* **Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood–brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation.** *Journal of neuroinflammation*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2012.

SAKAI, Ryota; KOMAI, Kyoko; IIZUKA-KOGA, Mana; YOSHIMURA, Akihiko; ITO, Minako. *Regulatory T Cells: Pathophysiological Roles and Clinical Applications.* *Keio J Med.*, v.69, n.1, p.1-15.

SAVINO, Benedetta ; CASTOR, Marina G.; CARONNI, Nicoletta; SARUKHAN, Adelaida; ANSELMO, Achille; BURACCHI, Chiara; BENVENUTI, Federica; PINHO, Vanessa; TEIXEIRA, Mauro M.; MANTOVANI, Alberto; LOCATI, Massimo; BONECCHI, Raffaella. **Control of murine Ly6Chigh monocyte traffic and immunosuppressive activities by atypical chemokine receptor D6.** *Blood*, v.119, n.22, p.5250-5260, 2012.

SUGIMURA, R.; JHA, D. K.; HAN, A.; SORIA-VALLES, C. *et al.* **Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells.** *Nature*, 545, n. 7655, p. 432-438, May 25 2017.

SUGITA, J.; YANADA, M. **Current status of conditioning regimens in haploidentical hematopoietic cell transplantation.** *Hematology*, 29, n. 1, p. 2332866, Dec 2024.

SHONO, Y.; DOCAMPO, M. D.; PELED, J. U.; PEROBELLI, S. M. *et al.* **Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease.** *Int J Hematol*, 101, n. 5, p. 428-437, May 2015.

SHULMAN, H. M.; CARDONA, D. M.; GREENSON, J. K.; HINGORANI, S.; HORN, T.; HUBER, E.; KREFT, A.; LONGERICH, T.; MORTON, T.; MYERSON, D. **NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21, n. 4, p. 589-603, 2015.

SOCIE, G.; MICHONNEAU, D. **Milestones in acute GVHD pathophysiology**. *Front Immunol*, 13, p. 1079708, 2022.

Su Y, Sun X, Liu X, Qu Q, Yang L, Chen Q, Liu F, Li Y, Wang Q, Huang B, Huang XJ, Zhang XH. **hUC-EVs-ATO reduce the severity of acute GVHD by resetting inflammatory macrophages toward the M2 phenotype**. *J Hematol Oncol*. v. 21 p.99. Jul, 2022

STOMA, Igor; KARPOV, Igor; KRIVENKO, Svetlana; ISKROV, Igor; MILANOVICH, Natalia; KORITKO, Alla; USS, Anatoly. **Mesenchymal stem cells transplantation in hematological patients with acute graft-versus-host disease: characteristics and risk factors for infectious complications**. *Ann Hematol.*, v.97, n.5, p.885-891, 2018.

TAKAHASHI, Kae; KATAYMA, Takayuki; ICHIKAWA, Takaya; MATSUOKA, Satomi; KAKINOKI, Yasutaka; YONEDA, Makoto; KIMURA, Akio; KOYAMA, Satoshi; YAHARA, Osamu. **A Case of Possible Chronic Graft-versus-host Disease in the Central Nervous System Manifesting as Cerebellar Ataxia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia**. *Internal Medicine*, p.9720-22, 2022.

TAUR, Y.; JENQ, R. R.; PERALES, M. A.; LITTMANN, E. R. *et al.* **The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**. *Blood*, 124, n. 7, p. 1174-1182, Aug 14 2014.

TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A.; GOMES, M. T.; LOPES, M. T. *et al.* **The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis***. *Plant Physiol Biochem*, 46, n. 11, p. 956-961, Nov 2008.

TESHIMA, T.; HASHIMOTO, D. **Separation of GVL from GVHD -location, location, location**. *Front Immunol*, 14, p. 1296663, 2023.

THOMAS, E. D. e colab. **Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy**. *N Engl J Med*. 1957.

THOMAS, E. e colab. **Bone-marrow transplantation (two parts)**. *N Engl J Med*. 1975.

THOMAS, E. D. **Bone marrow transplantation from the personal viewpoint**. *Int J Hematol*, 81, n. 2, p. 89-93, Feb 2005.

THOOLEN, B.; MARONPOT, R. R.; HARADA, T.; NYSKA, A. *et al.* **Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system**. *Toxicol Pathol*, 38, n. 7 Suppl, p. 5s-81s, Dec 2010.

TRIFILO, Matthew J. *et al.* **CC chemokine ligand 3 (CCL3) regulates CD8<sup>+</sup>-T-cell effector function and migration following viral infection**. *Journal of virology*, v. 77, n. 7, p. 4004-4014, 2003.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. **The liver**. *Curr Biol*, 27, n. 21, p. R1147-r1151, Nov 6 2017.

TONACO, L. A. B.; GOMES, F. L.; VELASQUEZ-MELENDZ, G.; LOPES, M. T. P. *et al.* **The Proteolytic Fraction from Latex of *Vasconcellea cundinamarcensis* (P1G10)**

**Enhances Wound Healing of Diabetic Foot Ulcers: A Double-Blind Randomized Pilot Study.** *Adv Ther*, 35, n. 4, p. 494-502, Apr 2018.

TU, S.; ZHONG, D.; XIE, W.; HUANG, W. *et al.* **Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Pathogenesis of Graft-versus-Host Diseases.** *Int J Mol Sci*, 17, n. 8, Aug 11 2016.

VARGA, I.; BABALA, J.; KACHLIK, D. **Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background.** *Surg Radiol Anat*, 40, n. 1, p. 21-29, Jan 2018.

VADAKKEL, G.; ENG, S.; PROLI, A.; PONCE, D. M. **Updates in chronic graft-versus-host disease: novel treatments and best practices in the current era.** *Bone Marrow Transplant*, 59, n. 10, p. 1360-1368, Oct 2024.

VRIESENDORP, Huib M.; HEIDT, Peter J. **History of graft-versus-host disease.** *Experimental hematology*, v. 44, n. 8, p. 674-688, 2016.

WANG, C. W.; HUANG, S. C.; LEE, Y. C.; SHEN, Y. J. *et al.* **Deep learning for bone marrow cell detection and classification on whole-slide images.** *Med Image Anal*, 75, p. 102270, Jan 2022.

WANG, H.; YANG, Y. G. **The complex and central role of interferon- $\gamma$  in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity.** *Immunol Rev*, 258, n. 1, p. 30-44, Mar 2014.

WANG, Qing *et al.* **Grape Seed Extract Attenuates Demyelination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice by Inhibiting Inflammatory Response of Immune Cells.** *Chinese Journal of Integrative Medicine*, p. 1-11, 2023.

WHANGBO, J. S.; ANTIN, J. H.; KORETH, J. **The role of regulatory T cells in graft-versus-host disease management.** *Expert Rev Hematol*, 13, n. 2, p. 141-154, Feb 2020.

WILL, A.; WYNN, R. **Diagnosis of acute graft-versus-host disease.** *Transplantation*, 81, n. 4, p. 505-506, Feb 27 2006.

WU, Jun; CHEN, Nu; LIU, Yongqing; GODLEWSKI, Grzegorz; KAPLAN, Henry J.; SHRADER, Sarah H.; SONG, Zhao-Hui; SHAO, Hui. **Studies of involvement of G-protein coupled receptor-3 in cannabidiol effects on inflammatory responses of mouse primary astrocytes and microglia.** *PLoS ONE*, v.16, n.5, e0251677, p.1-15, 2021.

XU, Z *et al.* **Targeting the chemokines in acute graft-versus-host disease.** *Front Immunol*, 2025.

YAN, Mei *et al.* **Weight loss in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation within the first 100 days: Its influencing factors and impact on clinical outcomes.** *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 2022.

YU, Hongshuang *et al.* **Dendritic Cell Regulation of Graft-Vs.-Host Disease: Immunostimulation and Tolerance.** *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 10, n. 93, p. 1-12, 2019.

ZEISER, R.; RINGDEN, O.; SADEGHI, B.; GONEN-YAACOVI, G. *et al.* **Novel therapies for graft versus host disease with a focus on cell therapies.** *Front Immunol*, 14, p. 1241068, 2023.

ZEISER, Robert; BLAZAR, Bruce R. **Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets.** *New England Journal of Medicine*, v.377, n.26, p. 2565-2579, 2017.

ZEISER, R.; TESHIMA, T. **Nonclassical manifestations of acute GVHD.** *Blood*, 138, n. 22, p. 2165-2172, Dec 2 2021.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. **Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy.** *N Engl J Med*, 377, n. 22, p. 2167-2179, Nov 30 2017.

ZEISER, R.; SOCIÉ, G.; BLAZAR, B. R. **Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation.** *Br J Haematol*, 175, n. 2, p. 191-207, Oct 2016.

ZEISER R, RINGDEN O, SADEGHI B, GONEN-YAACOVI G, et al., **Novel therapies for graft versus host disease with a focus on cell therapies.** *Front Immunol*. V.5;14 p. 120, n.256 2023 Oct 5;14:1241068

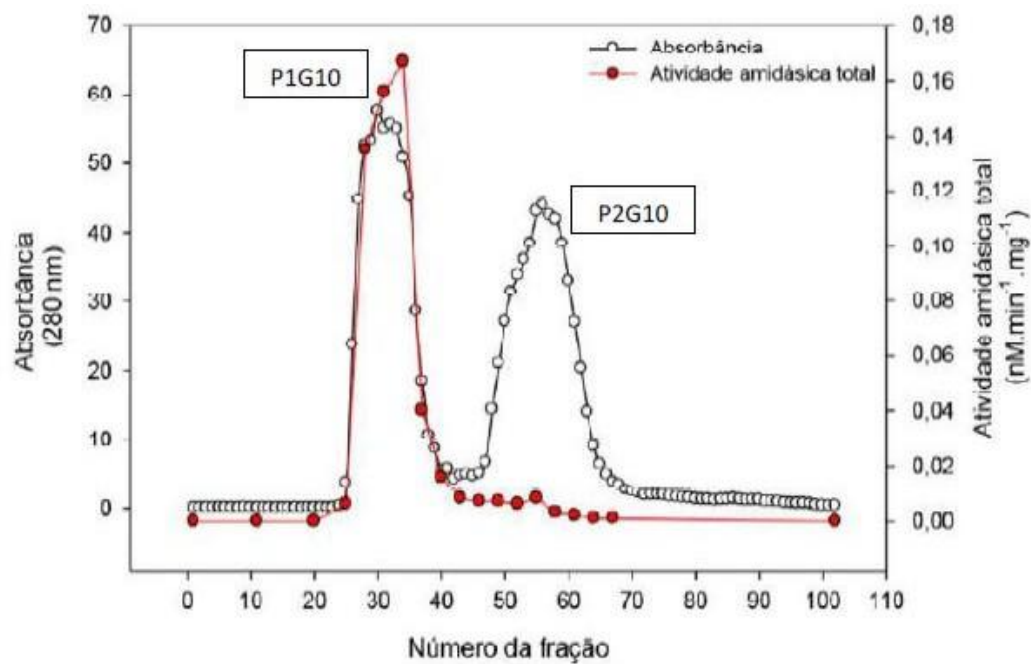
ZHANG, J.; WANG, F.; ZHONG, H.; PI, J. *et al.* **Oral sericin ameliorates type 2 diabetes through passive intestinal and bypass transport into the systemic circulation.** *J Ethnopharmacol*, 332, p. 118342, Oct 5 2024.

ZHANG, Binglei; CHEN, Lingyun; ZHOU, Jian; ZU, Yingling; GUI, Ruirui; LI, Zhen; WANG, Juan; YU, Fengkuan; ZHANG, Yanli; ZHAO, Huifang; JI, Zhenyu; SONG, Yongping. **Ruxolitinib early administration reduces acute GVHD after alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in acute leukemia.** *Scientific Reports*, , v. 11, n. 8501, p. 1-9, 2021.

ZHAO, Q.; TONG, L.; HE, N.; FENG, G.; LENG, L.; SUN, W.; XU, Y.; WANG, Y.; XIANG, R.; LI, Z. **IFN- $\gamma$  mediates graft-versus-breast cancer effects via enhancing cytotoxic T lymphocyte activity.** *Experimental and therapeutic medicine*, v.8, n.2, p.347-354, 2014.

ZHOU, D.; HUANG, C.; LIN, Z.; ZHAN, S. *et al.* **Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways.** *Cell Signal*, 26, n. 2, p. 192-197, Feb 2014.

**APÊNDICE A – Perfis cromatográficos de isolamento das proteases de *V. cundinamarcensis***



**Figura 1: Perfis cromatográficos de frações do látex de *V. cundinamarcensis*.** A – A solução do látex foi aplicada sobre a coluna Sephadex G10 e a determinação do perfil protéico (280 nm) e da atividade amidásica (BAPNA) permitiram a separação de dois picos bem definidos, P110 e P2G10.

**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 93/2023

Título do projeto: Efeito do Tratamento com a fração proteolítica da *Vasconcellea cundinamarcensis* látex (P1G10) na resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro em camundongos.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marina Gomes Miranda e Castor Romero

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 05/06/2023. Validade: 05/06/2023 a 04/06/2028.

Belo Horizonte, 05/06/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)