

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Isadora Oliveira Gondim

**DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (DECH) INDUZ RESPOSTA
INFLAMATÓRIA NA MEDULA ESPINHAL E GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL (GRD)**

Belo Horizonte
2024

Isadora Oliveira Gondim

**DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (DECH) INDUZ RESPOSTA
INFLAMATÓRIA NA MEDULA ESPINHAL E GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL
(GRD)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em ciências. Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dra. Barbara Maximino
Rezende

Co-orientador: Willian Antonio Gonçalves

Belo Horizonte

2024

043

Gondim, Isadora Oliveira.

Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) induz resposta inflamatória na medula espinhal e Gânglios da Raiz Dorsal (DRG) [manuscrito] / Isadora Oliveira Gondim. – 2024.

69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Barbara Maximino Rezende Gonçalves. Orientador: William Antonio Gonçalves.

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

1. Biologia Celular. 2. Inflamação. 3. Medula Espinal. 4. Gânglios Espinais. 5. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. I. Gonçalves, Barbara Maximino Rezende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ISADORA OLIVEIRA GONDIM

Às quatorze horas do dia 28 de agosto de 2024, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD) INDUZ RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA MEDULA ESPINHAL E GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL (DRG)**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Barbara Maximino Rezende Goncalves, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq. Instituição Indicação Dra. Barbara Maximino Rezende Goncalves UFMG Aprovada
Dra. Andreza Urba Hemocentro de Ribeirão Preto Aprovada
Dr. Thiago Avila UFJF Aprovada
Dr. William Antonio Gonçalves UFMG Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: ___Aprovada___

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Vinicius Ávila, Usuário Externo**, em 29/08/2024, às 17:05, 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 **Barbara Maximino Rezende Goncalves, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2024, às 09:56, 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 **Andreza Urba de Quadros Ferreira, Usuária Externa**, em 30/08/2024, às 14:10, 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 **William Antonio Gonçalves, Usuário Externo**, em 03/09/2024, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3507648** e o código CRC **3013E16E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abrir meus caminhos, permitindo-me vivenciar tantas oportunidades e conhecer pessoas importantes. Minha família, principalmente minha avó e minha mãe, que acreditaram em mim desde o início e me auxiliaram no processo de construir uma base muito importante de conhecimento. Ao meu pai e ao meu irmão, que também foram um apoio crucial nessa jornada, juntamente com pessoas que amo muito e representam um suporte em diversas questões. Apesar de não conseguir citar todos, eles sabem quem são e podem se sentir contemplados.

Agradeço à minha orientadora, Barbara, que aceitou me orientar sem me conhecer e ajudou no desenvolvimento das minhas habilidades e técnicas. Juntamente com seu marido William, meu co-orientador e figura importante na aquisição de amostras. Que essa família linda permaneça abençoada e torço para que ambos tenham muito sucesso.

O Laboratório de Imunofarmacologia representou um suporte para técnicas e práticas, sendo uma estrutura fundamental. Assim como o LAFACI, que também auxiliou na condução das atividades do projeto. Em ambos os locais encontrei pessoas que me ajudaram e esclareceram minhas dúvidas.

À equipe do CDTN pelas irradiações dos camundongos e aos agentes financiadores deste projeto: CAPES, FAPEMIG e CNPq.

RESUMO

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é um distúrbio inflamatório sistêmico que ocorre após o transplante alogênico de células hematopoiéticas, quando células imunes do enxerto reconhecem disparidades antigênicas do hospedeiro. Estas disparidades envolvem antígenos de histocompatibilidade maior (HLA) e menor (miHag). Quanto menor a compatibilidade entre doador e receptor, maior o risco de DECH. Embora órgãos como intestino, fígado, baço e pele sejam os mais estudados, outros como pulmão, timo, rim e sistema nervoso têm ganhado destaque. Neste estudo, investigamos o perfil celular e molecular na medula espinhal e nos gânglios sensoriais da raiz dorsal (GRD) de camundongos com DECH. Camundongos C57BL/6 foram submetidos a irradiação letal (9Gy) e receberam infusão intravenosa de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos BALB/c. A progressão clínica da DECH foi monitorada, evidenciando piora contínua nos animais afetados, enquanto o grupo controle permaneceu estável. A mortalidade no grupo DECH iniciou-se no 16º dia e atingiu 100% no 36º dia, enquanto o grupo controle apresentou 100% de sobrevivência. Na análise molecular, foi observada elevação significativa da expressão de IL-1 β e TNF- α na medula espinhal, e de IL-1 β , CCL2 e IFN- γ no GRD dos camundongos com DECH. Além disso, imunofluorescência revelou acúmulo de leucócitos nos GRDs. Utilizando o modelo de DECH humanizado (DECHhu), por meio do transplante de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) em camundongos NSG, verificou-se acúmulo de células humanas CD45+ nos GRDs e meninges. Para avaliar o impacto funcional da resposta inflamatória, analisamos parâmetros comportamentais. Camundongos com DECH percorreram menores distâncias e passaram menos tempo em pé sobre duas patas em comparação aos controles, indicando comprometimento funcional associado à inflamação no sistema nervoso. Esses dados demonstram, de forma inédita, que a DECH provoca resposta inflamatória na medula espinhal e GRDs, estabelecendo esses órgãos como alvos potenciais da doença.

Palavras-chave: DECH; SNC; Inflamação.

ABSTRACT

Graft-versus-host disease (GVHD) is a systemic inflammatory disorder that occurs after allogeneic hematopoietic cell transplantation when donor immune cells recognize host antigenic disparities. These disparities involve major histocompatibility antigens (HLA) and minor histocompatibility antigens (miHag). Lower compatibility between donor and recipient increases the risk of GVHD. While organs such as the intestine, liver, spleen, and skin are well-studied targets, others like the lung, thymus, kidney, and nervous system have gained attention. In this study, we investigated the cellular and molecular profile in the spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) of mice with GVHD. C57BL/6 mice underwent lethal irradiation (9Gy) followed by intravenous infusion of splenocytes and bone marrow cells from BALB/c donor mice. GVHD progression was monitored, revealing a continuous worsening of clinical signs in affected animals, whereas the control group remained stable. Mortality in the GVHD group began on day 16 and reached 100% by day 36, while the control group showed 100% survival. Molecular analysis showed a significant increase in IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the spinal cord and IL-1 β , CCL2, and IFN- γ in the DRG of GVHD mice. Furthermore, immunofluorescence revealed leukocyte accumulation in the DRGs. Using a humanized GVHD (GVHDhu) model, with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) transplanted into NSG mice, we observed the accumulation of human CD45⁺ cells in DRGs and meninges. To evaluate the functional impact of the inflammatory response, behavioral parameters were analyzed. GVHD mice traveled shorter distances and spent less time standing on two legs compared to controls, indicating functional impairment associated with nervous system inflammation. These findings demonstrate, for the first time, that GVHD induces an inflammatory response in the spinal cord and DRGs, establishing these organs as potential targets of the disease.

Keywords: GVHD; CNS; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O regime de condicionamento pré-transplante	16
Figura 2. Indução da DECH no modelo tradicional e no modelo humanizado	31
Figura 3. Avaliação dos sinais clínicos e da mortalidade relacionadas à DECH	41
Figura 4. O desenvolvimento da DECH está relacionado a um aumento da expressão de CXCL1, IFN-g e IL-1 β na medula espinhal	43
Figura 5. O desenvolvimento da DECH está relacionado a um aumento da expressão de CCL2, IFN-g e IL-1 β na medula espinhal	44
Figura 6. desenvolvimento da DECH está relacionado ao acúmulo de leucócitos no GRD Lombar	45
Figura 7. Recrutamento de leucócitos para o nervo, raiz ventral e GRD de animais com DECH.	46
Figura 8. Dot plot representativos da quimerização no modelo de DECH Hu 7 e 14 dias após o transplante.	47
Figura 9. Modelo de DECH Hu apresenta quimerização acima de 30% no sangue 28 dias após o transplante.	48
Figura 10. O desenvolvimento da DECH Hu está relacionado a um acúmulo de leucócitos humanos no GRD/meninges	49
Figura 11. O desenvolvimento da DECH reduz o comportamento locomotor e exploratório dos animais	51

LISTA DE ABREVIATURAS

DECH: Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
alo-HSCT: Transplante Alogênico de Células Hematopoiéticas (Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation)
HLA: Antígenos Leucocitários Humanos (Human Leukocyte Antigens)
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)
miHag: Antígenos de Histocompatibilidade Menor (Minor Histocompatibility Antigens)
LT: Linfócitos T
APCs: Células Apresentadoras de Antígeno
Th1, Th2, Th17: Linfócitos T Helper do Tipo 1, 2 e 17
FasL: Ligante de Fas (Fas Ligand)
ALT: Alanina Aminotransferase
AST: Aspartato Aminotransferase
SNC: Sistema Nervoso Central
IFN- γ : Interferon Gama
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-2: Interleucinas 2.
IL-4: Interleucinas 4
IL-5: Interleucinas 5
IL-6: Interleucinas, 6,
IL-12: Interleucinas 12
IL-13: Interleucinas 13
IL-17: Interleucinas 17
IL-23: Interleucinas 23
PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos
DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos
TLRs: Receptores Toll-like
ATP: Adenosina Trifosfato
P2X, P2Y: Receptores Nucleotídicos Purinérgicos Tipo X e Y
CSF-1: Fator Estimulador de Colônias 1
GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
LPS: Lipopolissacarídeos
IL-1 β : Interleucina 1 Beta
Teff: Células T Efetoras
Treg: Células T Reguladoras
MTX: Metotrexato
ATG: Globulina Antitimócito
mTOR: Alvo Mecanicístico da Rapamicina (Mechanistic Target of Rapamycin)
ADA: Adenosina Deaminase
GVL: Efeito Enxerto-Versus-Leucemia (Graft-Versus-Leukemia)
Hu: Camundongos Humanizados
NSG: NOD scid gamma (linhagem de camundongos imunodeficientes)
scid: Imunodeficiência Combinada Severa (Severe Combined Immunodeficiency)

IL2 γ ^{null}: Deficiência da Cadeia Gama do Receptor de Interleucina 2
NK: Células Natural Killer
DCs: Células Dendríticas
MHC I e II: Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I e II
PBMCs: Células Mononucleares do Sangue Periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
VCAM-1: Molécula de Adesão Vascular Celular-1
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular-1
Cx3cr1GFP/GFP: Linhagem de camundongos geneticamente modificados com a proteína fluorescente verde
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting (Citometria de Fluxo)
ACK :Ammonium-Chloride-Potassium
EDTA :Ácido Etilenodiamino Tetracético
PBS:Phosphate Buffered Saline
SFB :Soro Fetal Bovino
FITC: Fluoresceína Isotiocianato
PECy7: Ficoeritrina-Cianina 7
IgG1: Imunoglobulina G1
PFA:Paraformaldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)	13
1.2	Modelos experimentais de DECH	21
1.2.1	Modelo alogênico entre duas linhagens diferentes de camundongos	21
1.2.2	Modelo Humanizado de DECH	21
1.3	Sistema Nervoso	22
1.4	Alterações do sistema nervoso central e periférico relacionadas à DECH	25
2	OBJETIVOS GERAIS	27
2.1	Objetivos específicos	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Animais	28
3.2	Indução da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda	28
3.2.1	Isolamento das células doadas	28
3.2.2	Irradiação e transplante nos camundongos receptores C57BL/6	29
3.2.3	Irradiação e transplante nos camundongos receptores Balb/c	29
3.3	Indução da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda no modelo humanizado	30
3.4	Monitoramento e Avaliação da Quimerização	31
3.5	Avaliação dos parâmetros clínicos e mortalidade	32
3.6	Avaliação dos parâmetros comportamentais	34
3.7	Análise de citocinas e quimiocinas por PCR	35
3.8	Imunofluorescência	37
3.9	Citometria de fluxo de GRD/meninges	38
3.10	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Avaliação da morbimortalidade relacionada à DECH	41
4.2	Desenvolvimento da DECH aumenta a expressão de mRNA de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na medula espinhal e no GRD.	42
4.3	O desenvolvimento da DECH provoca o acúmulo de leucócitos próximos ao GRD	44
4.4	Animais submetidos ao modelo de DECH humanizado apresentam acúmulo de leucócitos CD45⁺ no GRD/meninge	47
4.5	Animais submetidos à doença do enxerto contra o hospedeiro apresentam redução do comportamento locomotor e exploratório	50

5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	57
7	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas é uma terapia amplamente utilizada para tratar diversas doenças, incluindo hematológicas, tais como leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfomas, mieloma múltiplo, e não hematológicas, tais como imunodeficiências, tumores sólidos, câncer testicular, neuroblastoma (DEVINE et al., 2011; MCCURDY et al., 2019). Contudo, o sucesso dessa terapia pode ser limitado pela toxicidade associada ao transplante, decorrente do regime de condicionamento (radioterapia e/ou quimioterapia) e da resposta imunológica das células T do doador contra os aloantígenos do receptor, que pode levar ao desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (MCCURDY et al., 2019; PATEL et al., 2022).

A DECH foi inicialmente descrita por Dick van Bekkum, um cientista holandês pioneiro na área de transplante de medula óssea, na década de 1950. Bekkum e sua equipe realizaram experimentos fundamentais que ajudaram a delinear a reação do sistema imunológico ao transplante de medula óssea, estabelecendo as bases para as práticas modernas de transplante de células-tronco hematopoiéticas. Essa equipe conduziu estudos sobre os efeitos da irradiação corporal total em resposta à "síndrome da radiação", que afetou milhares de pessoas expostas às bombas de Hiroshima e Nagasaki. Em 1956, eles conduziram experimentos com transplante de medula óssea em camundongos, comparando a sobrevivência entre aqueles que receberam somente irradiação e aqueles que, além da irradiação, receberam transplante de medula óssea isogênico ou alogênico (VRIESENDORP; HEIDT, 2016).

Os camundongos que receberam apenas irradiação morreram até o 20º dia devido à aplasia medular, conhecida como doença primária ou síndrome da medula óssea, uma condição em que a medula óssea perde sua capacidade de produzir células sanguíneas suficientes, incluindo hemácias, leucócitos e plaquetas. Aqueles que receberam transplante isogênico sobreviveram, enquanto os que receberam transplante alogênico faleceram após 20 dias, apresentando sintomas de uma síndrome secundária. Esses camundongos conseguiram reconstituir o sistema hematopoiético, mas desenvolveram falência múltipla de órgãos e lesões graves na pele, intestino, fígado e tecidos linfoides. O termo "doença secundária" foi então substituído por "graft-versus-host disease" (DECH) em 1962 (VRIESENDORP; HEIDT, 2016; FERRARA et al., 2009).

O primeiro transplante de medula óssea em humanos foi realizado em 1956 pelo Dr. E. Donnall Thomas, que mais tarde ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1990 pelo seu trabalho pioneiro. Este procedimento inovador foi realizado em um paciente com leucemia e envolveu a transferência de medula óssea saudável de um gêmeo idêntico. No Brasil, o primeiro transplante de medula óssea foi realizado em 1979, por uma equipe liderada pelo Dr. Ricardo Pasquini, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HENIG; ZUCKERMAN, 2014).

Este marco representou um avanço significativo na medicina brasileira, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas e protocolos que hoje fazem parte da rotina de diversos centros de tratamento do câncer e outras doenças hematológicas no país. Embora existam diferenças entre a DECH em humanos e a DECH experimental, modelos animais têm sido utilizados desde a década de 1970 para compreender os mecanismos da reação inflamatória associada à doença e desenvolver estratégias terapêuticas para o seu controle (HOWARD; WOODRUFF, 1961; VRIESENDORP; HEIDT, 2016).

A doença do enxerto contra o hospedeiro é um distúrbio inflamatório sistêmico, que ocorre quando as células imunes do enxerto reconhecem disparidades antigênicas do hospedeiro, após o transplante alogênico de células hematopoiéticas (alo-HSCT) (ZEISER.; BLAZAR, 2017; FERRARA et al., 2009; SUMMERS; SHETH.; BLEAKLEY, 2020). É uma doença que afeta cerca de 40% a 60% dos pacientes que recebem o transplante e causa alta morbidade, impactando na morte de 15 a 40% dos pacientes transplantados. Isto ocorre principalmente devido às diferenças entre os antígenos de histocompatibilidade maior (HLA) (denominados MHC em camundongos) e menor (miHag) entre doador e receptor. Quanto menor o grau de compatibilidade entre o doador e o receptor, maior é a chance de desenvolver DECH (FERRARA et al., 2009; HILL et al., 2017).

A resposta imunológica observada na DECH pode ser dividida em 3 fases. Na primeira fase, chamada de aferente, ocorre o regime de condicionamento, aonde o organismo do receptor é preparado, sendo submetido a um regime de quimioterapia e/ou radioterapia com o intuito de eliminar as células tumorais e evitar a rejeição do enxerto. Já na segunda fase, chamada fase de ativação ou fase eferente, ocorre a interação entre linfócitos T (LT) doados e células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor, induzindo à proliferação e polarização de linfócitos T em células T CD4⁺ do tipo T helper (Th1), (Th2) e (Th17) e células T CD8⁺ citotóxicas, com liberação de uma “tempestade” de citocinas e quimiocinas. Por fim, a terceira fase, fase efetora, é caracterizada pela migração das células T ativadas, que utilizam moléculas

indutoras de apoptose (perforinas, granzimas e FasL) e liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios responsáveis por agir no recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo, sendo os principais, o intestino, o fígado, a pele e, mais recentemente discutido, o sistema nervoso (GOLDBERG; RIZZO, 2015; NASSEREDDINE et al., 2017; MALARD; HUANG; SIM., 2020; BRAUN; ZEISER, 2021).

A DECH provoca sinais e sintomas relacionados à migração das células T ativadas para os órgãos alvo. Na pele, são percebidos sinais como exantema e lesões. No fígado, pode ocorrer elevação de bilirrubinas, e das enzimas fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Com relação ao trato gastrointestinal, podem ser percebidos aspectos como diarreia, sangramento, dilatação luminal e ulcerações irregulares no intestino (FERRARA et al., 2009). O envolvimento do sistema nervoso na doença do enxerto contra o hospedeiro, vem recentemente sendo explorado, e alguns trabalhos têm apontado que pacientes submetidos ao transplante alogênico podem apresentar complicações neurológicas em algum momento, podendo apresentar disfunção cognitiva, neuropatia craniana e convulsão, sugerindo que a alorreatividade observada na DECH pode ser responsável por essas complicações. Dados publicados anteriormente de modelos murinos de DECH aguda mostraram que as células T alorreativas podem se infiltrar no SNC e causar danos neuronais. A análise de DECH aguda em camundongos mostrou déficits de mobilidade, detectado pelo teste de nado forçado e déficits de aprendizagem, revelados em tarefas ativas de evitação de locais. No entanto, a memória de reconhecimento prejudicada, o comportamento exploratório reduzido e o aumento da ansiedade observados em camundongos com DECH aguda do SNC não foram detectados em camundongos com DECH crônica (RUGGIU et al., 2017; CHEN, 2022; VINNAKOTA; ZEISER, 2021; LI et al., 2021).

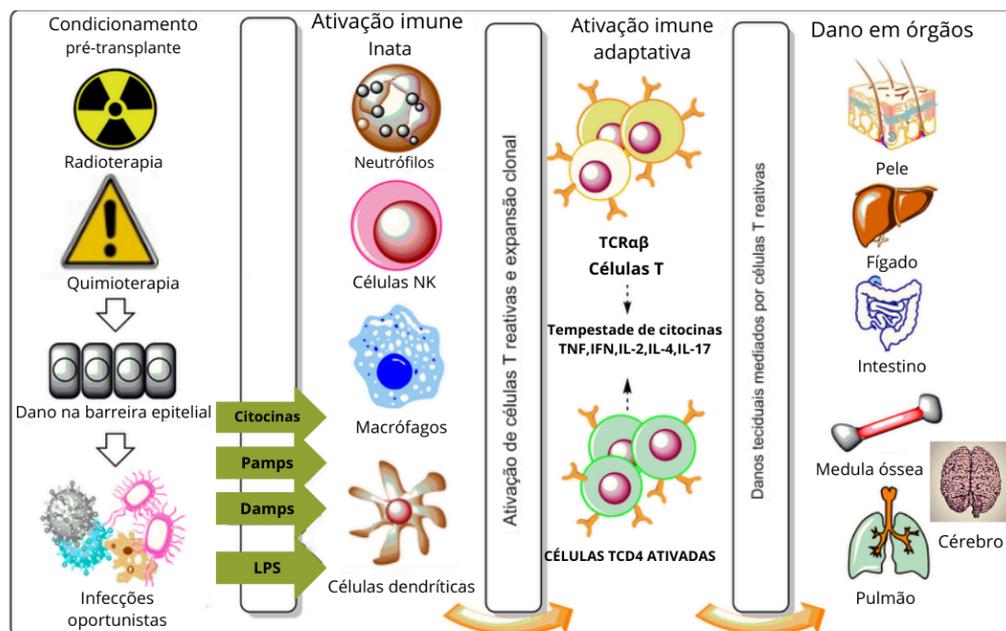


Figura 1. O regime de condicionamento pré-transplante (quimioterapia com ou sem radioterapia) contribui para o desenvolvimento da DECH, por meio da destruição tecidual, translocação bacteriana através das células mucosas intestinais e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e IL-7. Lipopolissacarídeo (LPS) e outros componentes da parede celular bacteriana que passam pela mucosa intestinal danificada estimulam células mononucleares, amplificam a produção de citocinas inflamatórias e contribuem para a apoptose. Células imunológicas inatas participam da destruição tecidual e produção de citocinas, um fenômeno referido como "tempestade de citocinas". Tanto as células apresentadoras de antígenos (APCs) do hospedeiro quanto do doador iniciam respostas da DECH através da liberação de IL-12 e IL-23. Células T ativadas, células natural killer (NK) e macrófagos mediam danos a órgãos-alvo através da produção de citocinas e efeitos citotóxicos diretos sobre os tecidos-alvo (liberação de grânulos citolíticos e expressão do ligante CD95). A DECH aguda desenvolve-se em alvos parenquimatosos contendo células altamente proliferativas (medula óssea, pele, fígado, intestino e pulmões) (Adaptado de VAFAKEKOLATHU; RUTELLA, 2017).

Durante a DECH aguda, as células T do doador reconhecem os antígenos do receptor como estranhos, levando à ativação das células Th1. Essas células produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-2, que amplificam a resposta imunológica e promovem o recrutamento de macrófagos e outras células inflamatórias. Esse ambiente inflamatório é o principal responsável pelos danos teciduais nos órgãos-alvo. A ativação de Th1 está associada a um padrão de inflamação mais agressivo, pode causar lesões intestinais graves, com aumento da permeabilidade intestinal e enterite grave. A inflamação hepática é exacerbada pela produção de citocinas, que levam a danos hepáticos, como colestase e necrose hepatocelular. O baço pode ser alvo devido à alta concentração de células imunes (KRENGER; FERRARA, 1996; NIKOLIC et al., 2000; JIANG et al., 2021).

As células Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que são mais associadas a respostas humoral, promovendo a ativação de células B. A resposta Th2 está mais relacionada com a DECH crônica, e está associada a manifestações esclerodermiformes, com fibrose cutânea e outras alterações crônicas na pele. Embora a resposta Th1 seja mais envolvida na fase aguda, a resposta Th2 pode ter um papel na fase crônica, promovendo fibrose hepática e danos colestatóxicos. A interação entre as respostas Th1 e Th2 contribui para a gravidade e a cronicidade da DECH, com a fase aguda sendo mais Th1 dominante e a fase crônica associada a uma resposta Th2 e à fibrose nos órgãos-alvo (NIKOLIC et al., 2000; JIANG et al., 2021).

Na DECH, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) desempenham um papel central na ativação do sistema imunológico e na progressão da resposta inflamatória. Os PAMPs são moléculas derivadas de patógenos, como lipopolissacarídeos de bactérias, que são reconhecidos por receptores específicos no sistema imune inato, como os receptores Toll-like (TLRs). Já os DAMPs são liberados por células do próprio organismo em situações de estresse ou dano, como fragmentos de DNA ou ATP extracelular, e também ativam o sistema imunológico por meio de receptores como os nucleotídeos purinérgicos (P2X e P2Y) (TOUBAI et al., 2016).

Tanto os PAMPs quanto os DAMPs podem desencadear uma resposta imunológica exacerbada, o que é crítico no contexto da DECH. Na fase inicial da DECH, o condicionamento pré-transplante, como quimioterapia ou radioterapia, causa danos significativos aos tecidos do paciente, levando à liberação de DAMPs. Esses sinais de dano alertam o sistema imunológico, desencadeando a ativação de células dendríticas, macrófagos e outras células do sistema imune inato, o que contribui para a ativação subsequente de células T (TOUBAI et al., 2016; NIKOLIC et al., 2000; JIANG et al., 2021).

A interação entre PAMPs, DAMPs, e a polarização para as respostas Th1 ou Th2 é um fator importante na gravidade e na evolução da DECH. O reconhecimento de DAMPs, liberados devido ao dano tecidual durante o condicionamento pré-transplante, pode amplificar as respostas imunes e perpetuar o ciclo inflamatório, agravando o ataque às células saudáveis do hospedeiro. Essa dinâmica inflamatória exacerbada, mediada por células T e citocinas pró-inflamatórias, é uma das razões pelas quais a DECH pode ser tão devastadora para os pacientes (TOUBAI et al., 2016; KRENGER; FERRARA, 1996; NIKOLIC et al., 2000; JIANG et al., 2021).

Macrófagos desempenham um papel crucial na DECH, pois influencia tanto na homeostase quanto em patologias, sendo conhecidos por sua alta diversidade funcional. A

diferenciação, proliferação e sobrevivência da maioria das populações de macrófagos dependem do fator estimulador de colônias 1 (CSF-1). Em resposta a citocinas e sinais microbianos locais, os macrófagos adquirem diferentes perfis funcionais, levando à sua classificação em "M1" e "M2". Os macrófagos M1, classicamente ativados, são essenciais na defesa contra bactérias, protozoários, vírus e têm um papel importante na imunidade antitumoral. A ativação dos macrófagos M1 é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , além de GM-CSF e lipopolissacarídeos (LPS), componentes bacterianos. Essas citocinas promovem a produção de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, e IL-12 (ALEXANDER et al., 2014)

Tanto as APCs do hospedeiro quanto as do doador desempenham papéis cruciais na iniciação da doença do enxerto contra o hospedeiro. As APCs do doador, presentes no enxerto, contribuem para a progressão da DECH, apresentando antígenos do receptor às células T do doador e liberando citocinas inflamatórias, como IL-12 e IL-23, exacerbando a resposta imunológica e agravando a destruição tecidual (MALARD et al., 2023). A IL-12, uma citocina produzida principalmente por APCs, como macrófagos e células dendríticas, tem papel central na resposta inflamatória aguda da DECH. Ela promove a diferenciação das células T CD4⁺ em células Th1, que são responsáveis por uma resposta inflamatória exacerbada. Na DECH, as APCs, tanto do receptor quanto do doador, secretam IL-12 em resposta ao reconhecimento de antígenos do hospedeiro. A ativação das células Th1 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-2, amplificando o ataque imunológico aos tecidos do receptor. Esse processo leva à destruição tecidual, especialmente em órgãos como a pele, o intestino e o fígado (Hill et al., 2021).

Além disso, a IL-23, também liberada pelas APCs do doador e do hospedeiro, promove a expansão e manutenção das células Th17. Essas células, por sua vez, produzem IL-17, uma citocina fortemente associada à inflamação crônica na DECH. Embora a IL-23 esteja mais relacionada à fase crônica da doença, que envolve fibrose e disfunção prolongada dos órgãos, ela também pode contribuir para a fase aguda ao sustentar a ativação de células T patogênicas, ampliando a resposta inflamatória (Hill et al., 2021). As APCs do hospedeiro desempenham um papel essencial na apresentação de antígenos próprios (self-antígenos) às células T do doador, estimulando a liberação de IL-12 e IL-23. Essa ação não apenas inicia a diferenciação das células T em Th1 e Th17, mas também amplifica a inflamação nos tecidos-alvo da DECH, como o intestino, a pele e o fígado.

Quanto à prevenção da DECH, geralmente são usados inibidores da calcineurina, como ciclosporina ou tacrolimus, para redução da expansão das células T efetoras (Teff), bloqueando a interleucina-2 (IL-2) e evitando a ocorrência da DECH aguda, mas isso inibe também as células T reguladoras (Treg). Assim, o desafio central na profilaxia da doença é controlar seletivamente as Teff, ao mesmo tempo em que preserva as funções das Treg (TESHIMA; HILL, 2021). O metotrexato (MTX) também é utilizado, especialmente na profilaxia da DECH, devido ao seu efeito anti-inflamatório em baixas doses, uma vez que reduz a ativação de células T. Contudo, em altas doses, o MTX pode causar toxicidade significativa, afetando o sistema hematopoiético, renal e hepático, além de causar lesões na mucosa gastrointestinal. Outra opção terapêutica profilática é o mofetil micofenolato, que inibe a atividade das células T e pode ser combinado com inibidores de calcineurina, particularmente após transplantes não mieloablativos ou de cordão umbilical (GOOPTU et al., 2021; ALBANESE et al., 2022).

Por sua vez, os tratamentos para a doença já estabelecida, continuam centrados principalmente no uso de corticosteroides como metilprednisolona e prednisona, frequentemente combinados com inibidores de calcineurina como ciclosporina A e tacrolimus. Estes agentes são cruciais para controlar a resposta imunológica exacerbada característica da DECH (MALARD; HUANG; SIM., 2020; SPYROU; LEVINE; FERRARA, 2022). Apesar da eficácia desses tratamentos, observa-se que apenas cerca de 50% dos pacientes respondem adequadamente, com os corticosteroides frequentemente associados a efeitos adversos graves, como imunossupressão, hiperglicemia e osteopenia (MALARD; HUANG; SIM., 2020; SPYROU; LEVINE; FERRARA, 2022).

A DECH refratária a esteroides é uma condição crítica, resultando na morte em mais de 70% dos pacientes. A definição de DECH aguda refratária a esteroides ainda não é clara, mas geralmente se considera a introdução de uma segunda linha de tratamento se não houver melhora em um órgão-alvo dentro de três dias ou se não houver resposta visível até o décimo quarto dia de tratamento (MEYERS et al., 2022). As terapias de segunda linha visam diferentes alvos imunológicos, incluindo a depleção de células T ou a inibição de sua ativação. Entre essas opções estão a globulina anti-timócito (ATG); anticorpos anti-CD52 (alemtuzumab); iCasp9, que induz a apoptose em linfócitos T doados; e agentes como abatacept, imunossupressor que atua como um modulador seletivo da coestimulação das células T; sirolimus, um imunossupressor que inibe a resposta das células T e B ao interferir com a sinalização intracelular do mTOR, ajudando a controlar a resposta imune que causa a DECH e pentostatina, um agente quimioterápico que inibe a adenosina deaminase (ADA), uma enzima

essencial para o metabolismo das purinas e o funcionamento das células T. A inibição da ADA pela pentostatina leva ao acúmulo de adenosina, o que reduz a proliferação e a ativação das células T (MALARD; HUANG; SIM., 2020; ALSUKHON et al., 2018; OIIAI et al., 2022). Outros agentes terapêuticos mantêm a população de linfócitos T regulatórios, como a ciclofosfamida, ou promovem a depleção de células B, como o rituximab (OIIAI et al., 2022).

Os antagonistas de receptores de quimiocinas, como o maraviroc, e agentes anti-TNF- α , como etanercept e infliximab, também são considerados. Esses medicamentos modulam a resposta inflamatória, crucial para o controle da DECH, ao bloquear a sinalização que promove a ativação das células T. Além disso, anticorpos anti-receptor de IL-2, como daclizumab e basiliximab, e novas moléculas regulatórias, como atorvastatina e bortezomib, estão sendo exploradas devido às suas capacidades de reduzir a ativação de células T e prolongar a resposta imune desejada (JULLIEN et al., 2022).

Apesar dos avanços, é crucial desenvolver terapias mais eficazes que permitam o controle da DECH sem comprometer o efeito do enxerto-versus-leucemia (GVL). Este efeito é essencial para a eliminação das células tumorais remanescentes, promovendo uma resposta imunológica benéfica para a cura da doença subjacente. O equilíbrio entre GVL e DECH é um desafio contínuo na gestão pós-transplante, destacando a necessidade de estratégias que maximizem o efeito GVL enquanto minimizam a incidência e gravidade da DECH (SHIMONI et al., 2022).

1.2 Modelos experimentais de DECH

1.2.1 Modelo alogênico entre duas linhagens diferentes de camundongos (Modelo de DECH tradicional)

O modelo alogênico entre duas linhagens diferentes de camundongos é um método estabelecido e eficaz para estudar a patogênese da DECH. Este modelo proporciona uma plataforma adequada para o desenvolvimento de novas terapias e para a compreensão dos mecanismos imunológicos subjacentes à doença. No modelo alogênico de DECH tradicional, células hematopoiéticas de um camundongo doador com linhagem geneticamente diferente são transplantadas para um camundongo receptor, levando ao desenvolvimento da DECH. Este processo mimetiza as condições em que a DECH ocorre em humanos após transplantes alogênicos de medula óssea ou células-tronco (SCHEURER et al., 2022).

A ablação da medula óssea pela irradiação letal induz imunossupressão, permitindo que o enxerto de células do doador se estabeleça sem ser atacado pelo sistema imunológico do receptor. A administração em duas doses ajuda a minimizar os danos colaterais aos tecidos não hematopoiéticos, melhorando a sobrevivência dos camundongos (SCHEURER et al., 2022; XIE et al., 2018). Após a irradiação, a infusão intravenosa de esplenócitos e células da medula óssea é fundamental. Os esplenócitos contêm uma alta proporção de células T maduras, essenciais para o desenvolvimento da DECH. Essas células T reconhecem o tecido do receptor como estranho e iniciam a resposta imunológica que causa a DECH. As células da medula óssea são necessárias para reconstituir o sistema hematopoético do receptor, garantindo um suprimento contínuo de células sanguíneas, incluindo células do sistema imunológico do doador, que participam da resposta da DECH (ZHAO; ZHANG; ZHENG, 2021).

1.2.2 Modelo Humanizado de DECH

Modelos murinos são ferramentas indispensáveis para o entendimento da patogênese de diversas doenças e para o desenvolvimento de terapias mais eficientes, representando um sistema vivo no qual é possível investigar os mecanismos biológicos e imunológicos subjacentes às doenças, testar novas terapias e observar os efeitos dessas intervenções em um organismo complexo (BILLERBECK et al., 2016). Eles oferecem várias vantagens, incluindo

a facilidade de manipulação genética, um ciclo de vida relativamente curto, e a existência de uma vasta gama de ferramentas e técnicas bem desenvolvidas para estudo genético e molecular. Esses modelos permitem a reprodução de aspectos específicos da patogênese humana, possibilitando uma compreensão mais aprofundada dos processos envolvidos e o desenvolvimento de terapias mais eficientes e direcionadas (ZHU et al., 2021; EHX et al., 2018). Apesar disso, existem diferenças dos sistemas biológicos de camundongos e do observado em humanos, principalmente em relação ao sistema imune, e por isso, foram criados camundongos de linhagens propositadamente imunossuprimidas denominados camundongos humanizados (Hu), como os NOD/Shi-scid IL2rynull (NOG), NOD/LtSz-scid IL2rynull (NSG) e BALB/c Rag2nullIL2rynull (BRG) (OLIVEIRA et al., 2020; BILLERBECK et al., 2016). Estes camundongos não possuem linfócitos T, linfócitos B, células NK, e apresentam macrófagos e células dendríticas (DCs) não funcionais. Por isso, são capazes de receber infusão de células humanas e são reconstituídos com estas células, permitindo o estudo de várias doenças e mimetizando de maneira mais fidedigna os achados clínicos observados em humanos. O desenvolvimento de DECH nos hu-camundongos ocorre devido a xeno-reatividade de células humanas com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e classe II (MHC I e II) do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2020; BILLERBECK et al., 2016).

O transplante de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) para camundongos humanizados induz DECH espontânea entre 15 e 50 dias após o transplante, sem a necessidade de irradiação dos animais NSG receptores, e foi este modelo de DECH humanizado que foi utilizado em nosso projeto (EHX et al., 2018).

1.3 Sistema Nervoso

Do ponto de vista anatômico o sistema nervoso pode ser dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é composto pelo encéfalo e pela medula espinhal. A camada externa do cérebro, conhecida como córtex cerebral, é responsável pelas funções cognitivas superiores, como pensamento, e do processamento de informações de natureza sensorial e motora (THAU; REDDY; SINGH, 2022).

A medula espinhal se continua inferiormente ao tronco encefálico e ocupa o canal vertebral ao longo dos seguimentos correspondentes às regiões da coluna vertebral: cervical, torácica, lombar e sacral. Sua estrutura inclui a substância cinza e a substância branca. A

substância cinza, localizada no interior da medula espinhal e organizada em forma de "borboleta", é composta por corpos celulares de neurônios e é responsável pelo processamento de reflexos e pela transmissão de informações motoras e sensoriais. A substância branca, ao redor da substância cinza, é composta por axônios mielinizados que formam feixes de fibras nervosas, transmitindo sinais aferentes e eferentes, ou seja, responsáveis pela transmissão dos estímulos entre o sistema nervoso central e o resto do corpo (DIAZ; MORALES, 2016). Entre estes, temos o sistema nervoso periférico, que os conecta anatomicamente. Entre seus componentes temos os nervos, gânglios e terminais nervosos. Os últimos ocupam diversas regiões e órgãos, e se continuam como nervos que alcançam o tronco encefálico (nervos cranianos) ou a medula espinhal (nervos espinhais). Os nervos espinhais emergem de cada segmento da medula espinhal e conectam-na aos músculos e órgãos, transmitindo as informações sensoriais e motoras (DIAZ; MORALES, 2016; GANAPATHY; REDDY; TADI, 2022).

O SNP conecta o SNC a todas as outras partes do corpo e é dividido em duas seções principais: o sistema nervoso somático e o sistema nervoso autônomo. O sistema nervoso somático controla as ações voluntárias e transmite informações sensoriais do corpo para o SNC. Anatomicamente, inclui os nervos cranianos e espinhais. Existem 31 pares de nervos espinhais que emergem da medula espinhal e se distribuem pelas regiões cervical, torácica, lombar e sacral, conectando o SNC a diversas partes do corpo. Os nervos cranianos, por sua vez, são 12 pares que emergem diretamente do cérebro e têm funções específicas, controlando a motricidade e a sensibilidade na cabeça e pescoço. Os nervos sensoriais do sistema nervoso somático transmitem informações cinestésicas, nociceptivas e térmicas que são transduzidas pelos receptores sensoriais e transmitida para o SNC, enquanto os nervos motores levam comandos do SNC para os músculos esqueléticos, coordenando os movimentos voluntários (MURTAZINA; ADAMEYKO, 2023; PARAMEL MOHAN; RAMALINGAM, 2021; JANG; GARRAWAY, 2024).

O sistema nervoso autônomo regula funções involuntárias, como as atividades cardíacas, respiratórias e digestivas. Este sistema se divide em duas partes: o sistema nervoso simpático e o sistema nervoso parassimpático. Em contraste, o sistema nervoso parassimpático promove atividades de "repouso e digestão", ajudando o corpo a relaxar e conservar energia. Seus nervos têm origem no tronco encefálico e na medula espinhal sacral e utilizam nervos cranianos, como o nervo vago (X par de nervos cranianos), para inervar órgãos internos e promover funções calmantes e de recuperação. O sistema nervoso simpático prepara o corpo

para situações de estresse ou emergência, ativando a resposta de "luta ou fuga". Anatomicamente, seus nervos originam-se da medula espinhal e formam cadeias de gânglios simpáticos paravertebrais ao longo da coluna vertebral e se constitui também por pares de gânglios pré-vertebrais (celíacos, renais e mesentéricos) (MURTAZINA; ADAMEYKO, 2023; PARAMEL MOHAN; RAMALINGAM, 2021).

Os gânglios são órgãos que agregam corpos de neurônios localizados fora do SNC. Além dos gânglios simpáticos (paravertebrais, celíacos, renais e mesentéricos), que são localizados fora do canal vertebral, existem os gânglios sensoriais da raiz dorsal (GRD), localizados acoplados à medula espinhal. Cada GRD é uma massa de corpos celulares dos neurônios responsáveis pela função sensorial (JANG; GARRAWAY, 2024). Esses neurônios desempenham papéis diversos, sendo alguns especializados na detecção de estímulos nocivos, como os nociceptores. Sobre sua anatomia, reconhece-se uma região rica em corpos neuronais, e outra rica em axônios. A parte rica em axônios apresenta não apenas fibras centrais e periféricas provenientes dos neurônios contidos na parte rica em corpos neuronais, mas compartilha também fibras motoras e do sistema nervoso autônomo que compartilham a região ventral nessa parte (JIMENEZ-ANDRADE et al., 2008). Vale ressaltar que uma porção considerável desse órgão também é envolvido por uma projeção da meninge espinhal, sendo, portanto, um órgão também exposto ao mesmo microambiente molecular e estrutural que se observa para o SNC (JOUKAL et al., 2016), como por exemplo, à variação dos componentes do líquido cefalorraquidiano e ao contato com as estruturas que formam as superfícies das lâminas meníngeas (JOUKAL et al., 2016).

A infiltração celular no SNP é um processo complexo, envolvendo recrutamento, adesão e migração de células imunes, mediado por alterações na barreira endotelial e na matriz extracelular. Esse fenômeno está associado a diversas condições patológicas, como neuropatias periféricas e esclerose múltipla, que comprometem suas funções. Inicialmente, sinais químicos, como quimiocinas, orientam a quimiotaxia, enquanto citocinas, como TNF- α e IL-1, promovem a comunicação celular e recrutam células imunes para combater infecções ou remover tecidos danificados. A adesão ao endotélio vascular é facilitada por moléculas como integrinas e selectinas, permitindo a migração para áreas inflamadas (WOFFORD et al., 2022; SINGH et al., 2023).

A disfunção da barreira endotelial, frequentemente causada por alterações na expressão de proteínas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1, aumenta a permeabilidade vascular, intensificando a infiltração celular. No SNP, células T e B podem atacar diretamente seus

componentes, enquanto macrófagos e microglia desempenham funções que variam entre proteção e destruição, dependendo do microambiente inflamatório (WOFFORD et al., 2022; SINGH et al., 2023). A resposta inflamatória no SNP é caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6, que aumentam a permeabilidade vascular e provocam mudanças funcionais em células neuronais, como por exemplo, distúrbios da função sensorial, responsáveis pela hiperativação de componentes do aparato nociceptivo (SAXTON; GLASSMAN; GARCIA, 2022; JANSEN et al., 2022).

1.4 Alterações do sistema nervoso central e periférico relacionadas à DECH

As manifestações clínicas da DECH no Sistema Nervoso Central são heterogêneas, podendo envolver manifestações cerebrovasculares, encefalite ou mielite. No caso da DECH crônica, existem relatos que o envolvimento do SNC é menos comum do que as lesões do Sistema Nervoso Periférico. No SNP, a DECH crônica pode ocorrer em diferentes níveis anatômicos e envolver o nervo periférico, a junção neuromuscular ou o músculo e fáscia adjacente (VINNAKOTA; ZEISER, 2021). Entretanto, o comprometimento do sistema nervoso na DECH de forma geral, com ênfase na DECH aguda, é ainda pouco explorado, e os mecanismos imunopatológicos da doença do enxerto contra o hospedeiro no sistema nervoso permanecem pouco claros (CHEN, 2022).

Segundo Ruggiu et al. (2017) em alguns casos de óbito por DECH, a autópsia revelou infiltração frequente de células T, apoiando a hipótese de uma doença do SNC imunomediada após o alo-HSCT. Já em camundongos com DECH, as necrópsias cerebrais, além de revelarem infiltração de células T, demonstraram ativação da micróglia e anormalidades semelhantes à angeíte, que é uma doença que causa inflamação vascular das meninges, do parênquima cerebral e da medula espinhal (RUGGIU et al., 2017; CHEN, 2022; VINNAKOTA; ZEISER, 2021). Apesar disso, os mecanismos relacionados à lesão do sistema nervoso mediada pela DECH ainda precisam ser melhor elucidados.

As regiões lombar e torácica do GRD são altamente inervadas e desempenham um papel crucial na transmissão de sinais sensoriais, incluindo a dor e outras sensações somáticas. A região lombar é diretamente responsável pela inervação dos membros inferiores e do tronco, enquanto a região torácica inerva áreas como o tórax e o abdômen, sendo especialmente relevantes para estudos relacionados à dor neuropática e à inflamação (AHIMSADASAN et al., 2022; CHEN, 2022; JI; DONNELLY.; NOCELLI, 2013.).

Essas áreas são particularmente sensíveis à inflamação periférica e central. Em condições de inflamação sistêmica, como na DECH, as células imunes podem migrar para o GRD, promovendo respostas neuroinflamatórias que afetam a função neural e podem causar danos aos neurônios sensoriais. Estudos indicam que a inflamação crônica no sistema nervoso periférico está associada à ativação glial no GRD, contribuindo para a sensibilização neural e exacerbando os sintomas de dor. Essas características fazem das regiões lombar e torácica alvos importantes para a avaliação de infiltração celular e alterações imunológicas, com implicações diretas no manejo de condições inflamatórias e neuropáticas (AHIMSADASAN et al., 2022; CHEN, 2022)..

Na DECH, os sinais clínicos mais comuns, como alterações intestinais e hepáticas, lesões de pele e sensibilidade exacerbada, podem ser associados ao comprometimento das áreas inervadas pelas regiões lombar e torácica da medula espinhal. Esses sintomas refletem diretamente a resposta inflamatória exacerbada e o dano tecidual causado pela ativação imunológica, especialmente em locais ricos em terminações nervosas (AHIMSADASAN et al., 2022; CHEN, 2022; JI; DONNELLY.; NOCELLI, 2013).

A análise das células imunes nos GRDs pode mostrar a migração de células T, macrófagos e outros mediadores inflamatórios que participam da resposta exacerbada, correlacionando com sintomas clínicos como dor neuropática e hipersensibilidade cutânea. Isso reforça a relevância da investigação dessas regiões para entender melhor a relação entre as alterações celulares no GRD e as manifestações clínicas de dor e inflamação nos pacientes com DECH.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resposta inflamatória que ocorre na medula espinhal e gânglios da raiz dorsal de camundongos submetidos à DECH.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a sobrevida e evolução dos aspectos clínicos de camundongos submetidos à DECH;
2. Avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas na medula espinhal e gânglios da raiz dorsal de camundongos submetidos à DECH;
3. Avaliar o acúmulo de leucócitos na medula espinhal e gânglios da raiz dorsal de camundongos submetidos à DECH em modelo tradicional e modelo humanizado da doença;
4. Avaliar o comportamento de camundongos submetidos à DECH.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais:

Para o experimento de indução do modelo tradicional da DECH, foram utilizados camundongos entre 8 e 12 semanas de vida, das linhagens C57BL/6J e Balb/c, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG. Para realização da técnica de microscopia confocal, foram utilizados animais Cx3cr1^{GFP/GFP}. Para o experimento de indução do modelo humanizado de DECH, foram utilizados camundongos entre 8 e 12 semanas de vida, da linhagem NSG. Todos os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e acesso livre à água e comida. Considerando a imunossupressão dos animais NSG, estes foram mantidos em micro isolador e todo o material que teve contato com eles, incluindo comida e água, foram autoclavados. Todos os procedimentos experimentais realizados na execução deste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) através do protocolo 10/2024.

3.2 Indução da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda: modelo tradicional

3.2.1 Isolamento das células doadas

Os animais doadores foram eutanasiados com sobredose de cetamina (120 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), seguida de deslocamento cervical. O baço dos camundongos foi removido e macerado suavemente em uma placa de Petri utilizando uma peneira de Nylon de 70 µm, em 5 mL de meio RPMI incompleto gelado. As células foram transferidas para um tubo Falcon e deixadas decantar por 3 minutos para remover agregados. Em seguida, as células foram centrifugadas a 350 g, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspenso em 10 mL de meio RPMI incompleto para contagem de células usando a câmara de Neubauer, com o corante Tripán na diluição de 1:200, para avaliar a viabilidade e o número de células injetadas nos receptores.

Para isolamento das células da medula femoral, ambos os fêmures de cada camundongo foram retirados e suas cabeças cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13x0,38 mm para lavagem da medula com 3 ml de meio RPMI incompleto gelado.

Posteriormente, as células foram colocadas em tubos Falcons, identificados e separados para medula e baço. Os Falcons foram colocados na centrífuga a 4 graus Celsius e 1500 rpm (406 g) por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Tripán na diluição de 1:100. Esta contagem foi realizada para analisar a viabilidade e o número de células a serem injetadas no camundongo receptor.

3.2.2 Irradiação e transplante nos camundongos receptores C57BL/6

Os camundongos receptores C57BL/6 foram submetidos a uma irradiação letal de 9Gy de radiação gama, administrada em duas doses de 4,5 Gy com um intervalo de duas horas, utilizando uma fonte de cobalto-60 (CO60) no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No dia seguinte da irradiação, os camundongos receberam uma infusão intravenosa de 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula óssea isoladas dos fêmures e tíbias de camundongos doadores parentais BALB/c. O grupo controle do transplante foi composto por camundongos C57BL/6 que receberam células de outros camundongos C57BL/6, mimetizando um modelo de transplante singênico, onde não se desenvolve DECH.

Todos os grupos experimentais receberam tratamento profilático com o antibiótico ciprofloxacino, diluído em água filtrada (70 mg/L) e administrado via bebedouro. A água contendo o antibiótico foi trocada a cada 2 dias durante os primeiros 15 dias após a irradiação, para prevenir infecções secundárias decorrentes da imunossupressão induzida pela ablação total da medula óssea.

3.2.3 Irradiação e transplante nos camundongos receptores Balb/c

No experimento de imunofluorescência, foram utilizados como animais doadores, camundongos reporter Cx3cr1^{GFP/GFP}, que carregam um alelo knock-in/knock-out da proteína fluorescente verde monomérica (GFP) de Cx3cr1^{GFP/GFP}, com a finalidade de observarmos se ocorre a infiltração de monócitos da circulação para o GRD em animais Balb/c receptores. Para tanto, esses animais geneticamente modificados foram utilizados como doadores de células da medula óssea e esplenócitos para animais Balb/c, mantendo o mesmo protocolo de isolamento citado no item 3.2.1. Os camundongos receptores Balb/c foram submetidos a uma irradiação letal de 7Gy de radiação gama, administrada em duas doses de 3,5 Gy com um intervalo de

duas horas, utilizando uma fonte de cobalto-60 (CO60) no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No dia seguinte à irradiação, os camundongos receberam uma infusão intravenosa de 1×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula óssea isoladas dos fêmures e tíbias de camundongos doadores parentais Cx3cr1^{GFP/GFP}/C57BL/6J. O grupo controle do transplante foi composto por camundongos Balb/c que receberam células de outros camundongos Balb/c, mimetizando um modelo de transplante singênico, onde não se desenvolve DECH. O tratamento profilático com ATB também foi realizado nesses animais.

3.3 Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (DECH) aguda no modelo humanizado

Os camundongos receptores NSG foram utilizados em um modelo humanizado de DECH. Para o experimento, os camundongos não foram submetidos à irradiação. O grupo denominado DECHhu, foi constituído por camundongos que receberam uma infusão intravenosa de 1×10^7 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), retirado de doador do sexo masculino e sem uso de medicamento, enquanto o grupo controle recebeu uma infusão de solução salina 0,9%.

Para a infusão das células, a suspensão de PBMCs foi preparada a partir de amostras de sangue periférico humano. O sangue foi coletado e processado para isolar as células mononucleares através de centrifugação em gradiente de densidade. Após a separação, as PBMCs foram lavadas em meio DMEM incompleto gelado e centrifugadas a 350 g, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuscitado em 10 mL de meio DMEM incompleto para contagem de células usando a câmara de Neubauer, com o corante Tripán na diluição de 1:200, para avaliar a viabilidade e o número de células injetadas nos receptores.

Um total de 1×10^7 PBMCs foi injetado intravenosamente nos camundongos NSG do grupo DECHhu, ressuscitado em salina 0,9%. Os camundongos do grupo controle receberam apenas uma infusão de salina na mesma quantidade e volume.

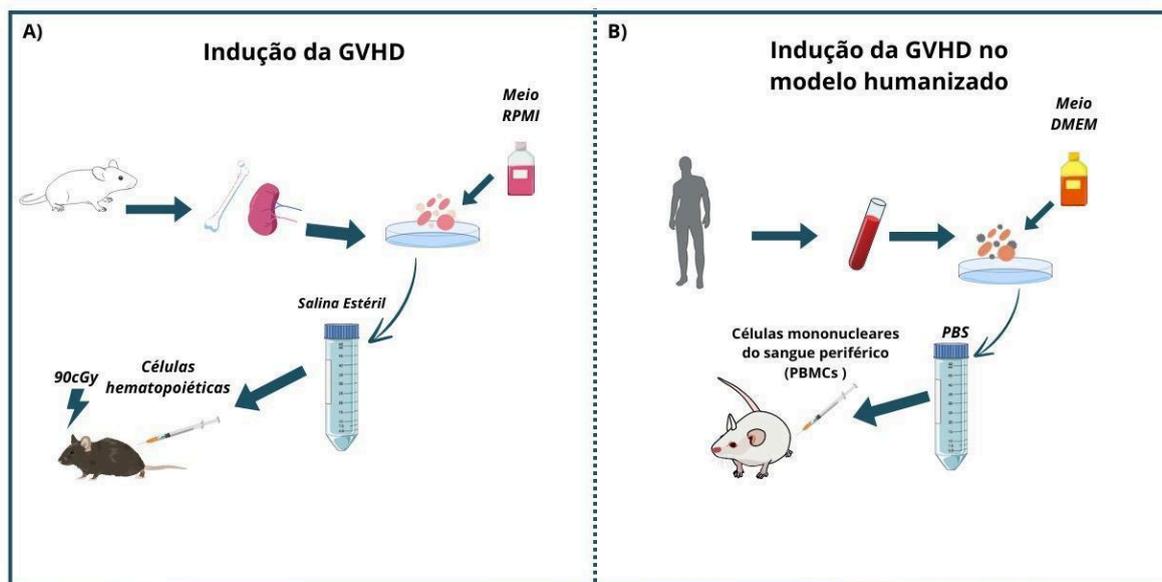


Figura 2. Indução da DECH no modelo tradicional e no modelo humanizado. (A) Indução do modelo tradicional de DECH e (B) modelo humanizado de DECH.

3.4 Monitoramento e Avaliação da Quimerização

O monitoramento da quimerização em camundongos NSG foi realizado por citometria de fluxo. As amostras foram coletadas semanalmente, por Punção da Veia Submandibular (Veia Facial), realizada no fluxo laminar, incluindo o grupo DECH e um animal do grupo controle que recebeu apenas salina e não desenvolveu a doença. Após a realização da imobilização manual do camundongo, foi identificado um pequeno ponto sem pelos localizado ao longo da curvatura da mandíbula do camundongo. Não foi realizada a assepsia no local da punção com álcool etílico 70%, pois pode interferir na formação da gota e interferir na coleta. Com a ponta da agulha foi realizada uma pressão firme logo acima desse ponto sem pêlos, onde está localizada a veia submandibular. A coleta foi realizada rapidamente, em um tubo plástico cônico de 1,5mL com EDTA (para prevenir coagulação). As gotas de sangue formadas após punção da veia foram colocadas, até atingir o volume de 200 microlitros. Para realizar a hemostasia, foi aplicado gentilmente pressão no local da coleta, utilizando gaze estéril, antes de retornar o animal à gaiola. Quando o animal apresentava apatia após a coleta, foi realizada reposição do volume de sangue perdido, com salina estéril por via intravenosa. Para a lise de hemácias, adicionaram-se 2 mL de solução ACK comercial às amostras, que foram incubadas por 5-10 minutos para garantir a ruptura das hemácias, mantendo as células nucleadas intactas.

Posteriormente, as células nucleadas foram separadas das hemácias lisadas por centrifugação a 350 g, a 4°C por 5 minutos. O pellet de células foi transferido para uma placa de fundo em U, usando FACS buffer (soro fetal bovino (SFB) 2%, diluído em PBS) para garantir a transferência completa e evitar ultrapassar a capacidade dos poços, sendo 4 amostras do grupo DECH, uma amostra de controle e uma amostra extra do grupo DECH, que não foi marcada com anticorpos.

Para a análise de quimerização, utilizaram-se os seguintes anticorpos com diluição 1:100: Anti-human CD45 FITC e Anti-mouse CD45 PECy7, Anti-human IgG1 FITC e Anti-human IgG1 PECy7. O mix de anticorpos foi preparado com 0,4 µL de Anti-human CD45 FITC, 0,2 µL de Anti-mouse CD45 PECy7, e 20 µL de FACS buffer por amostra, sendo armazenado protegido da luz e no gelo. O mix de anticorpos foi adicionado a cada amostra, que foram incubadas no gelo, protegidas da luz, por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com FACS buffer e centrifugadas para remover os anticorpos não ligados. O sobrenadante foi descartado e sobre o pellet foi adicionado 200 µL de Fixation buffer (PFA 1% em PBS, pH 7.4) por poço. Após 20 minutos de incubação no gelo, a placa foi centrifugada a 300 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão rápida e adicionado novamente 200 µL de FACS buffer por poço. As amostras foram armazenadas na geladeira protegidas da luz para leitura no dia seguinte.

3.5 Avaliação dos parâmetros clínicos e mortalidade

Os seguintes parâmetros clínicos foram acompanhados a cada 2 dias nos dois modelos de DECH: variação do peso corporal, piloereção, integridade da pele, atividade, postura em flexão do tronco e ocorrência de diarreia. Cada parâmetro clínico recebeu uma pontuação de 0 a 2 conforme sua presença (2)/ausência (0) ou intensidade: leve (0,5)/ moderada (1)/intensa (2) conforme detalhado na tabela 1. A soma de todos os parâmetros atingiu no máximo 12 pontos. Essa análise foi realizada no mesmo local, considerando a importância da ambientação dos animais, para obter resultados confiáveis e evitar alterações de comportamento.

A lesão na pele observada nos camundongos foi caracterizada por áreas de eritema, descamação e ulceração. A avaliação da integridade da pele incluía o monitoramento dessas alterações, com pontuação proporcional à gravidade: leve (0,5) para eritema discreto, moderada (1) para descamação ou pequenas áreas ulceradas, e intensa (2) para ulcerações extensas ou sinais de infecção.

A atividade dos camundongos foi avaliada com base em seu comportamento geral. Atividade leve (0,5) incluiu movimentos mais lentos, porém constantes; atividade moderada (1) foi caracterizada por diminuição na interação com o ambiente e os outros camundongos, com períodos de inatividade prolongados; e atividade intensa (2) indicou imobilidade ou movimento mínimo, sugerindo sofrimento significativo ou desconforto extremo.

Os critérios de eutanásia foram estabelecidos para garantir o bem-estar animal e incluíram: Perda de peso corporal superior a 20% do valor inicial; Incapacidade de se alimentar ou beber; Postura em flexão do tronco associada à dor intensa, falta de resposta a estímulos ou sinais de sofrimento intenso; Presença de lesões cutâneas severas que não apresentassem sinais de cicatrização e estivessem associadas a infecções ou necrose e outros sinais graves de comprometimento sistêmico, como dificuldade respiratória ou convulsões .

Esses parâmetros clínicos foram monitorados até que um dos grupos experimentais alcançasse 100% de mortalidade, permitindo uma avaliação contínua da progressão da condição estudada nos camundongos.

Tabela 1: Escala clínica. Verificação dos parâmetros clínicos ocasionados pela reação inflamatória ocasionada pela DECH. Adaptada a partir de dados da literatura (COOKE et al., 2001; COLSON et al., 2004; CASTOR et al., 2012; REZENDE et al., 2013; BERNARDES et al., 2015).

Parâmetros Clínicos	Pontuação
Peso corporal	0: Sem perda de peso 0,5: Perda de peso até 10% 1: Perda de peso entre 10 e 20% 2: Perda de peso superior a 20%
Piloereção	0: Ausência 2: Presença
Integridade da pele	0: ausência de lesão 1,0: Presença de lesão moderada 2,0: presença de lesão máxima
Atividade	0: sem alteração aparente 0,5: apatia leve 1,0: apatia moderada 2,0: letargia.
Postura	0: sem inclinação aparente 0,5: inclinação leve 1,0: inclinação moderada 2,0: inclinação grave.
Diarreia	0: ausência 1,0: pastosa 2,0: líquida
Total	12 Pontos

3.6 Avaliação dos parâmetros comportamentais

As estruturas cerebrais envolvidas nos comportamentos observados incluem o córtex pré-frontal, que está associado à tomada de decisões e planejamento; a amígdala, que processa emoções e respostas ao medo; e o hipocampo, que é crucial para a memória espacial e navegação. Alterações no comportamento observadas no teste de campo aberto podem refletir

mudanças na função dessas estruturas e são úteis para avaliar o impacto de intervenções, como tratamentos farmacológicos ou manipulações genéticas, sobre o comportamento do animal. Este método é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, eficácia e capacidade de fornecer informações valiosas sobre a atividade e a resposta emocional dos animais em situações experimentais controladas (VÕIKAR, STANFORD, 2023).

O sistema nervoso periférico, que inclui nervos sensoriais e motores, é responsável pela coordenação dos movimentos e pela percepção do ambiente. Neste trabalho, para observação dos animais, foi construída uma caixa dividida em quadrados, com marcações no centro, e o espaço entre uma marcação e outra representava 1 centímetro, totalizando 10 quadrados. Isso permitiu uma medição precisa da distância percorrida pelos animais. Foi realizada a observação dos animais em campo aberto durante 5 minutos. Foi quantificado, em centímetros, o caminho percorrido e o número de vezes que os animais ficaram sobre as patas traseiras, comparando o grupo controle e o grupo DECH. O teste foi realizado no início dos sinais da doença (11 dias após o transplante) e no início da mortalidade (15 dias após o transplante), por um mesmo avaliador, baseado no protocolo de Mei et al. (2020).

3.7 Análise de citocinas e quimiocinas por PCR

Os GRDs foram coletados para análises de expressão de mRNA. O procedimento teve início com a anestesia do animal, utilizando uma sobredose de cetamina (120 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), assegurando a ausência de dor e movimento. Após isso, foi realizada uma perfusão intracardiaca com 3 ml de PBS (phosphate buffered saline), seguida de 3 ml de PFA 4% (paraformaldeído).

A laminectomia foi realizada removendo a parte posterior em arco da vértebra, criando uma abertura que permitiu o acesso aos GRDs. A área ao redor da coluna foi desinfetada e os pelos removidos, seguida de uma incisão na pele sobre o local correspondente ao gânglio da raiz dorsal. A pele e os tecidos subjacentes foram cuidadosamente separados com bisturi e lâmina para expor as vértebras. Com a laminectomia finalizada, os gânglios foram isolados e removidos com cuidado.

Foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies Corporation- Carlsbad, CA, EUA) para extração de RNA total dos tecidos coletados de acordo com as instruções do fabricante. A pureza total do RNA foi determinada usando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific- Waltham, MA, EUA). Foi analisada a taxa de absorção do

comprimento de onda (260/230 nm e 280/260 nm) entre 1,8 e 2,0, respectivamente. Uma mistura contendo a transcriptase reversa, SuperScript III, inibidor recombinante de ribonuclease (RNase Out; Invitrogen Life Technologies Corporation- Carlsbad, CA, EUA) e ditioneitol (DTT; 1 mM) foi utilizada para a transcrição reversa do RNA total em cDNA. Para PCR quantitativo, o reagente Power SYBR Master Mix (Invitrogen Life Technologies Corporation Carlsbad, CA, EUA) e iniciadores (Integrated DNA Technologies- Coralville, IA, EUA) mais cDNA foram colocados em uma placa de 96 poços em duplicata. Em seguida, foi utilizado um sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) para realizar a reação programada: aquecimento inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 60 segundos e 60°C por 1 min. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi usado para calcular o limiar do ciclo (CT), e o nível de expressão será normalizado pelos níveis de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), em comparação com os controles tratados com PBS.

Para a análise de citocinas e quimiocinas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foi necessário primers específicos para cada alvo:

Tabela 2: Primers mRNA que foram utilizados para PCR, CCL2, CXCL1, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α e primers, Forward e Reverse.

mRNA	Primer
CCL2	Forward: 5'-TCTGGGCCTGCTGTTGAC-3' Reverse: 5'-ACCCCTTCTTCTTGCTTG-3'
CXCL1	Forward: 5'-GCCAGCCTTCCCTTCTTCT-3' Reverse: 5'-AGGCAAGTCCAGGGGTTCT-3'
IFN- γ	Forward: 5'-GACGTCATCGTCTGGACG-3' Reverse: 5'-TGAGTCTGCTGCTGAGTCC-3'
IL-1 β	Forward: 5'-GCCCATCCTCTGTGACTC-3' Reverse: 5'-GACCCAGCAGGTTGACTA-3'
TNF- α	Forward: 5'-TCTTCTCGAACCCGAGTGAC-3' Reverse: 5'-TTGGTGGTTTGCTACGACG-3'

3.8 Imunofluorescência

Para o experimento de indução do modelo tradicional da DECH utilizando Balb como receptores, foram utilizados camundongos entre 8 e 12 semanas de vida, das linhagens C57BL/6J Cx3cr1^{GFP/GFP} (cedidos gentilmente pelo professor Gustavo Menezes, do departamento de Morfologia do ICB/UFMG) e Balb/c, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG. Os camundongos receptores Balb/c foram submetidos a uma irradiação letal de 7 Gy de radiação gama, administrada em duas doses de 3,5 Gy com um intervalo de duas horas, utilizando uma fonte de cobalto-60 (CO60) no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No dia seguinte da irradiação, os camundongos receberam uma infusão intravenosa de 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula óssea isoladas dos fêmures e tíbias de camundongos doadores parentais C57BL/6J Cx3cr1^{GFP/GFP}.

O grupo controle do transplante foi composto por camundongos Balb/c que receberam células de outros camundongos Balb/c, mimetizando um modelo de transplante singênico, onde não se desenvolve DECH. Todos os grupos experimentais receberam tratamento profilático com o antibiótico ciprofloxacino, diluído em água filtrada (70 mg/L) e administrado via

bebedouro. A água contendo o antibiótico foi trocada a cada 2 dias durante os primeiros 15 dias após a irradiação, para prevenir infecções secundárias decorrentes da imunossupressão induzida pela ablação total da medula óssea.

A eutanásia foi realizada quando o escore dos animais estava entre 9 e 12 pontos. Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão intracardíaca com 3ml de PBS (phosphate buffered saline) seguido por mais 3ml de PFA 4% (paraformaldeído). Em seguida, foi coletado o último GRD torácico e o primeiro GRD lombar. Esses órgãos foram preparados para serem submetidos à técnica de microscopia confocal. Para tanto, eles foram delicadamente manipulados e dispostos na superfície da lâmina histológica e devidamente fechados com meio de montagem e lamínula.

A aquisição das imagens foi feita pelo microscópio confocal LSM 880 da Zeiss. As imagens foram processadas pelo software FIJI.

3.9 Citometria de fluxo de GRD/meninges

Para análise do acúmulo de leucócitos no GRD/meninge no modelo humanizado de DECH foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Inicialmente, o tecido foi coletado rapidamente, por laminectomia (como especificado anteriormente), após a perfusão dos camundongos com PBS 1X pH 7,2. O tecido coletado foi imediatamente colocado em 500 μ L de DMEM suplementado com 10% de SFB em eppendorf de 2 mL de fundo chato até a coleta de todos os animais. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de DMEM contendo 1 mg/mL de colagenase tipo VIII e 0,1 mg de DNase tipo 1 por amostra e realizou-se incubação por 40 minutos a 37°C na estufa sob agitação manual a cada 5 minutos. Após a incubação, a solução foi homogeneizada e 500 μ L de DMEM suplementado com 10% de SFB foi imediatamente adicionado, homogeneizando novamente.

Os tecidos digeridos foram passados em peneira de Nylon de 70 μ m com o auxílio de um êmbolo de seringa de 1 mL, utilizando pouca força e sendo delicado. Após, foram adicionados mais 500 μ L de DMEM + SFB 10% para inativação da colagenase. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 450 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 300 μ L de meio DMEM+ SFB 10% para contagem em câmara de Neubauer com azul de Tripán em uma diluição de 1:200. Após a contagem, os tubos foram centrifugados a 450 g por 5 minutos a 4°C, e sob o pellet foram adicionados 10 μ L do mix de anticorpos para a marcação de superfície (anticorpo anti-mouse CD45 PEcy7 e os anticorpos

anti-human CD45 FITC, CD3 APC, CD4 V510, CD8 PE), ou os anticorpos de compensação (Anticorpo anti-CD3 marcado com FITC, Anticorpo anti-CD3 marcado com PE, Anticorpo anti-CD3 marcado com APC, Anticorpo anti-CD3 marcado com PECy7), diluídos em BSA a 1% nas concentrações previamente padronizadas. Os eppendorfs foram incubados por 30 minutos na geladeira, protegidos da luz. Depois, foram adicionados 200 µl de PBS 1x gelado para parar a reação com os anticorpos. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 200 µl de formol a 2% e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente.

As amostras foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspensado em 300 µl de PBS/BSA a 1% e as amostras deixadas na geladeira overnight para leitura no dia seguinte.

Considerando os anticorpos e os fluoróforos utilizados, foi necessário fazer dois mix de anticorpos:

Tabela 3: Anticorpos utilizados para Citometria de fluxo. Tabela apresentando MIX, anticorpos, fluoróforo, código, marca e diluição.

Mix	Anticorpo	Fluoróforo	Código	Marca	Diluição
Mix 1	CD45	FITC	304006	BioLegend	1:100
	CD45	PECy7	110730	BioLegend	1:100
	CD3	APC	300312	BioLegend	1:100
	CD4	V510	317444	BioLegend	1:100
Mix 2	CD8	PE	300908	BioLegend	1:100
	CD3	FITC	555274	Pharmlngen	1:100
	CD3	PE	555275	Pharmlngen	1:100
	CD3	PECy7	100220	BioLegend	1:100
	CD4	APC	553051	Pharmlngen	1:100
	CD19	V510	115545	BioLegend	1:100

3.10 Análise estatística:

Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste t Student. Para dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Mann Whitney (para dois grupos) ou Kruskal- Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunnet. Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro SEM. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da morbimortalidade relacionada à DECH

Para avaliar a progressão dos sinais clínicos da DECH, utilizamos uma escala de escore clínico, desenvolvida para avaliar a presença e a gravidade dos sinais da doença nos animais. Este escore inclui avaliação da perda de peso, atividade, descamação da pele, eriçamento dos pelos, diarreia e postura. Para cada parâmetro é atribuída uma pontuação específica, que é então somada para determinar o escore total como detalhado na Tabela 1.

Paralelamente, foi construída uma Curva de Sobrevivência para representar a taxa de sobrevivência dos animais após o desenvolvimento da DECH. Cada animal foi monitorado diariamente, registrando a sobrevivência até o momento do óbito ou o término do estudo.

Foi observado que o grupo DECH apresentou progressiva piora dos sinais clínicos ao longo do tempo, enquanto que o grupo controle, que não desenvolveu a doença permaneceu estável (Figura 3A). A morte do primeiro animal do grupo DECH ocorreu 16 dias após a indução da doença, e o último animal do grupo morreu no 36º dia pós-transplante (Figura 3A). Conforme o esperado, o grupo controle apresentou 100% de sobrevivência (Figura 3B).

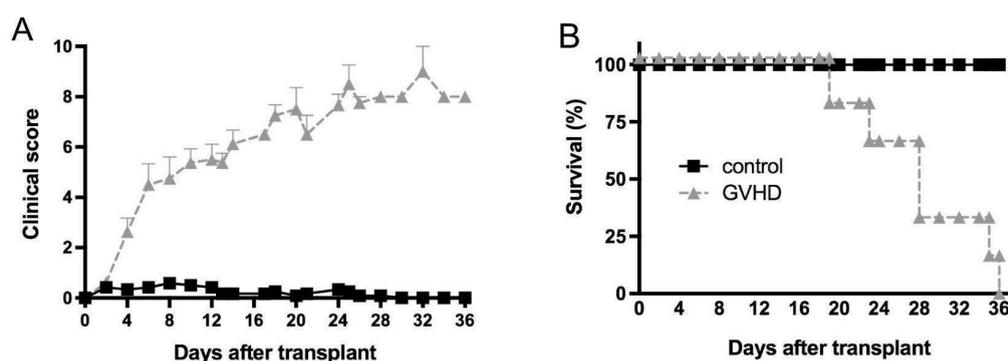


Figura 3. Avaliação dos sinais clínicos e da mortalidade relacionadas à DECH. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram

avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença (A) e sobrevida (B). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ao grupo DECH, respectivamente.

4.2 Desenvolvimento da DECH aumenta a expressão de mRNA de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na medula espinhal e no GRD

Os danos teciduais resultantes do regime de condicionamento pré-transplante (irradiação e/ou quimioterapia) favorecem a ocorrência da DECH. Após esse processo inicial, na segunda fase, conhecida como fase de ativação, ocorre a interação entre linfócitos T doados e células apresentadoras de antígeno do receptor, induzindo à proliferação e polarização de linfócitos T em células T CD4 e CD8, com liberação de uma “tempestade” de citocinas e quimiocinas. Essas moléculas, por sua vez, podem contribuir para a migração das células T ativadas para órgãos alvo da doença (BRAUN; ZEISER, 2021; GOLDBERG; RIZZO, 2015). Nesse contexto, foi realizado um PCR para detectar e quantificar a expressão de mRNA de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na medula espinhal e no GRD de animais submetidos à DECH.

O grupo DECH apresentou aumento da expressão de mRNA da quimiocina CXCL1 (Figura 4A) e das citocinas IFN γ e IL-1 (Figura 4C e 4D, respectivamente), na medula espinhal. Além disso, houve um aumento da expressão de mRNA da quimiocina CCL2 (Figura 5A), e das citocinas IFN γ e IL1-b (Figura 5C e 5D, respectivamente), no GRD.

Spinal cord

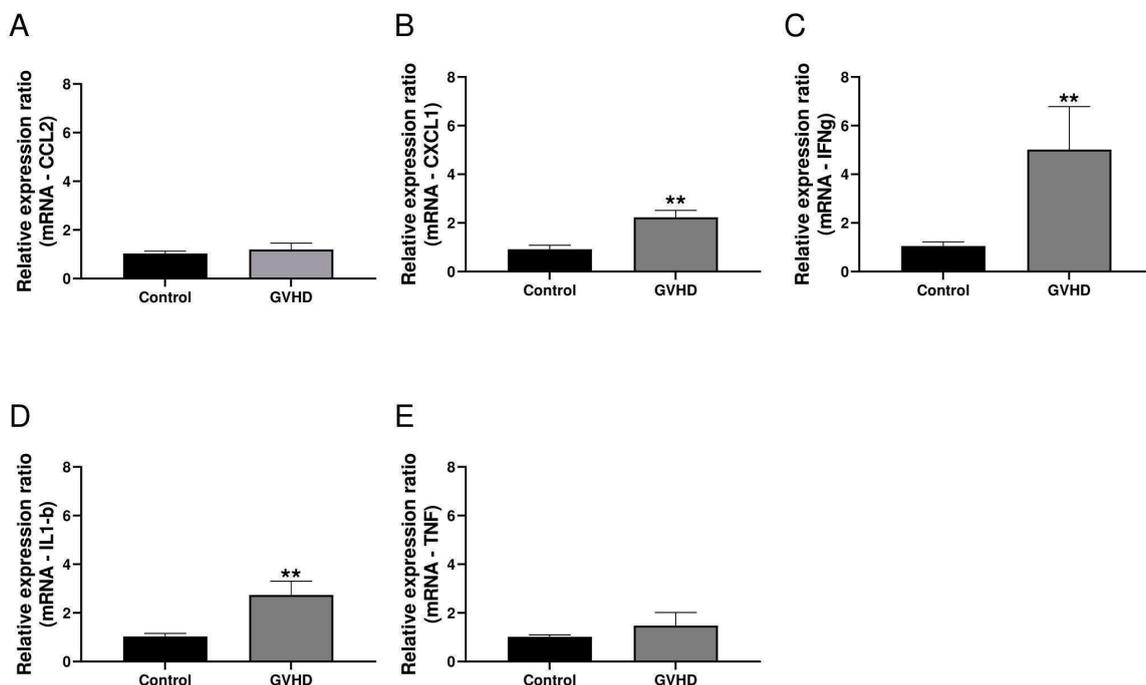


Figura 4. O desenvolvimento da DECH está relacionado a um aumento da expressão de CXCL1, IFN-g e IL-1 β na medula espinhal. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença e eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos. mRNA de CCL2 (A), CXCL1 (B), IFN-g (C), IL-1 β (D) e TNF (E) foram avaliadas em homogenatos da medula espinhal por PCR. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo DECH.

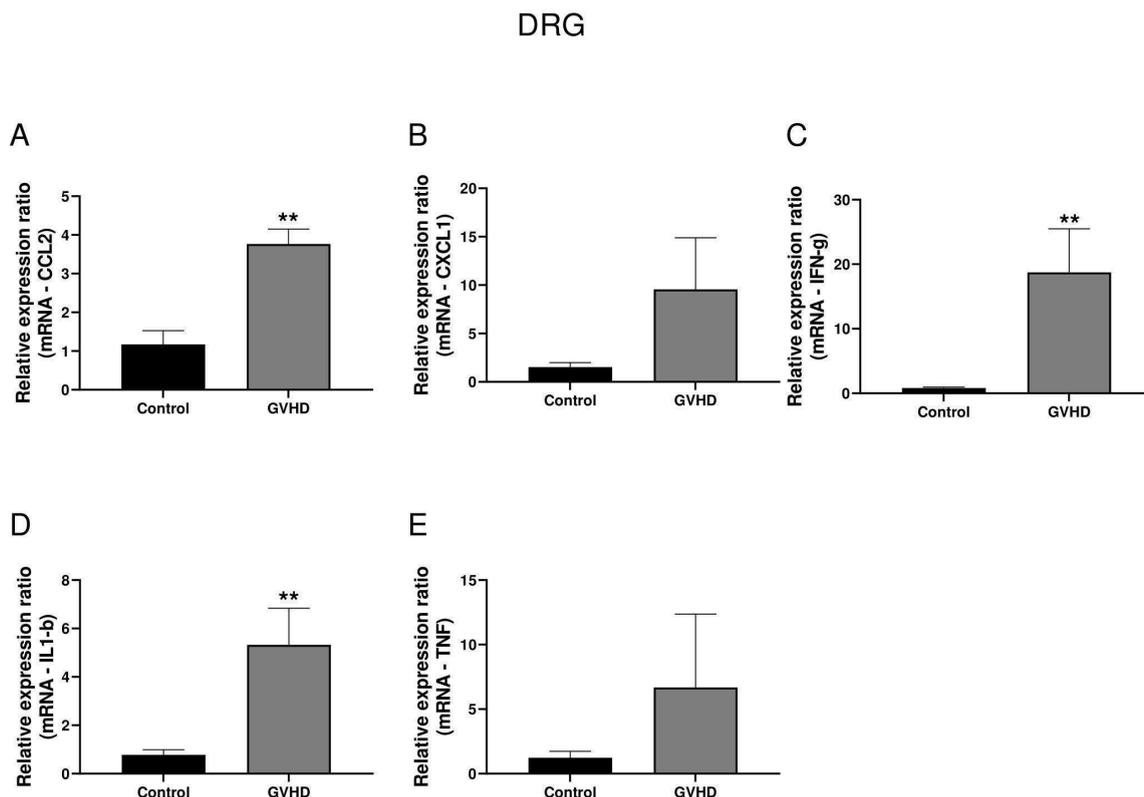


Figura 5. O desenvolvimento da DECH está relacionado a um aumento da expressão de CCL2, IFN γ e IL-1 β no GRD. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença e eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos. mRNA de CCL2 (A), CXCL1 (B), INF (C), IL-1 β (D) e TNF (E) foram avaliadas em homogenatos do GRD por PCR. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo DECH.

4.3 O desenvolvimento da DECH provoca o acúmulo de leucócitos próximos ao GRD

Para indução da DECH utilizando animais doadores que expressam Cx3cr1^{GFP/GFP}, animais Balb/c machos foram irradiados e, subsequentemente, receberam 1×10^7 células provenientes da medula óssea e baço de de animais Cx3cr1^{GFP/GFP}. Portanto, quando quimerizados, esses animais passaram a exibir uma população de leucócitos Cx3cr1^{GFP/GFP}.

Nos animais NAIVE (camundongos Cx3cr1^{GFP/GFP} saudáveis, não submetidos à irradiação ou transplante) não observamos a presença de células Cx3cr1^{GFP/GFP} no nervo do GRD lombar, e apenas uma pequena quantidade dessas células na raiz ventral acoplada a esse

órgão. Porém, após a indução da DECH, observamos um aumento da presença dessas células na raiz ventral, e aumento no recrutamento de células $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ para o nervo do GRD lombar (Figura 6).

Já no GRD torácico, notou-se uma perda da arquitetura tecidual acompanhada por aparente recrutamento de células $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ para o parênquima do GRD de animais doentes comparados ao GRD de animais NAIVE saudáveis (Figura 7).

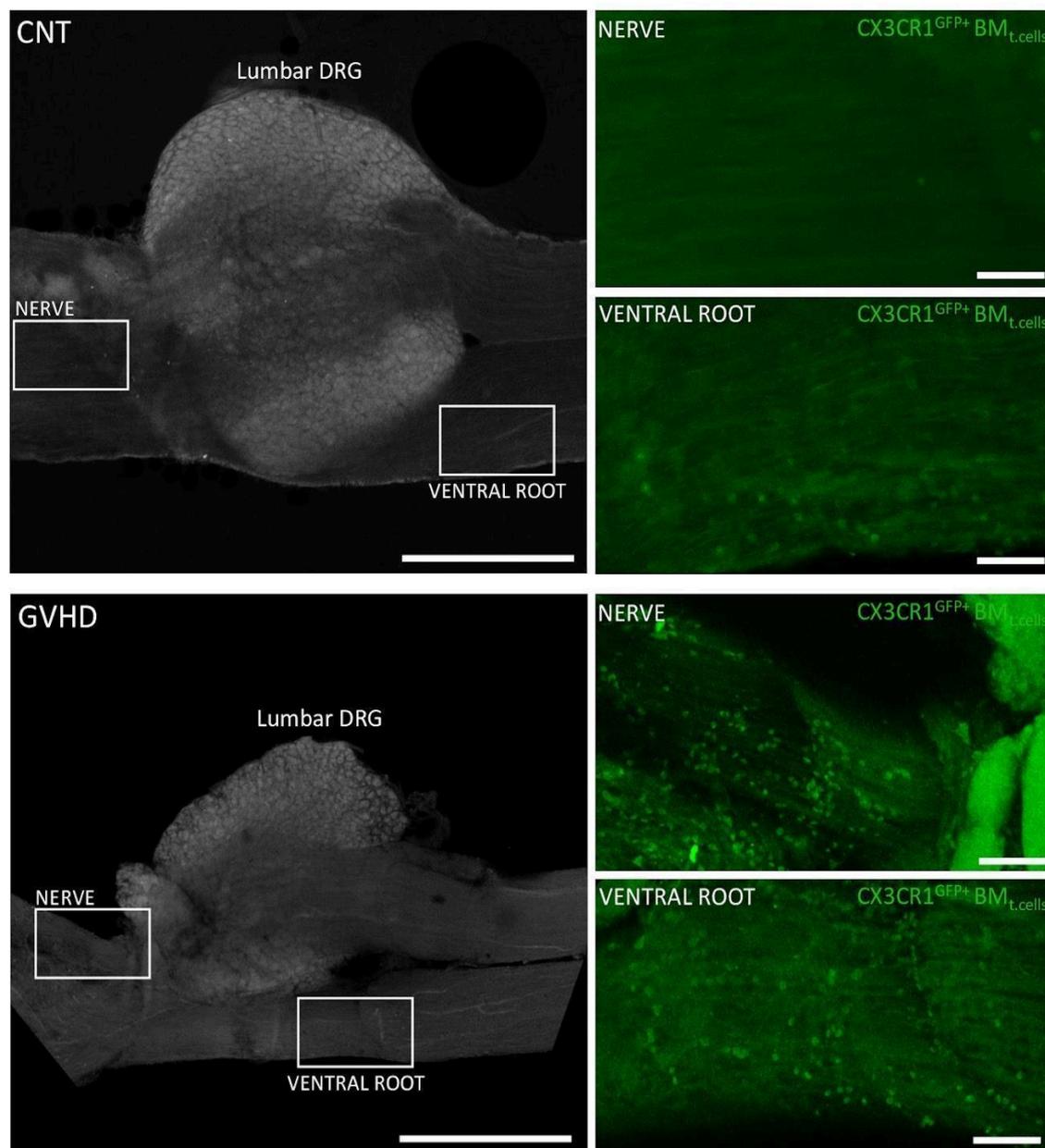


Figura 6. O desenvolvimento da DECH está relacionado ao acúmulo de leucócitos $CX3CR1^+$ no GRD lombar. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J

geneticamente modificados que carregavam um alelo knock-in/knock-out de proteína fluorescente verde monomérica (GFP) de CX3CR1. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença e eutanasiados quando o escore clínico atingiu entre 9 a 12 pontos. Em seguida, a presença de leucócitos foi avaliada no GRD lombar, por imunofluorescência.

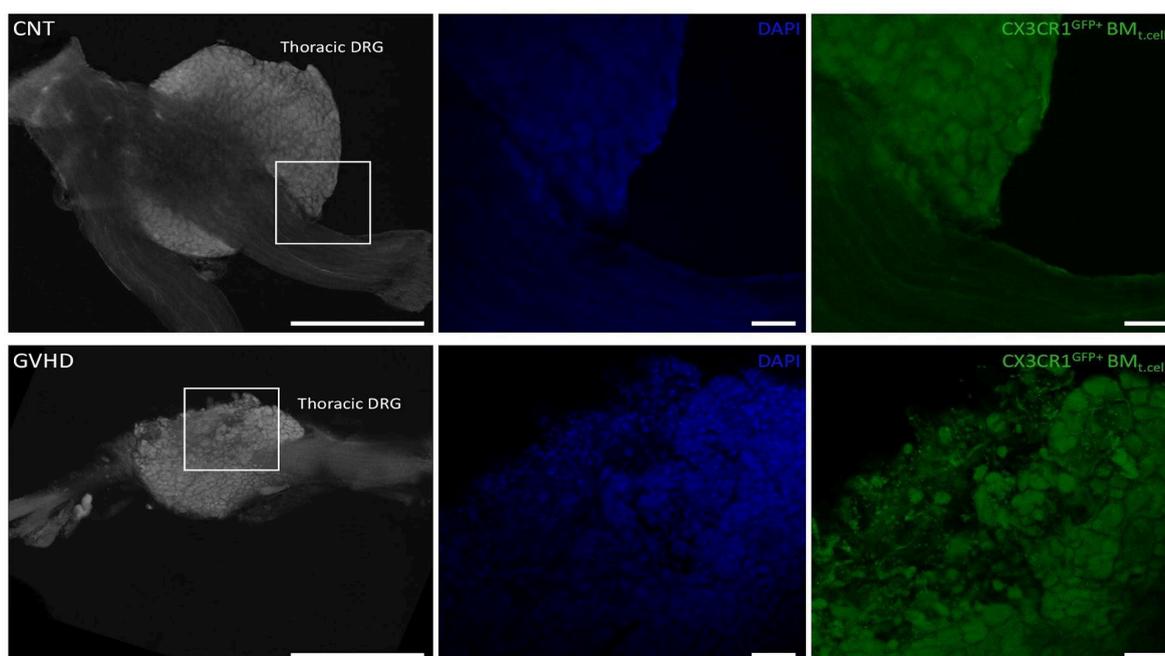


Figura 7. Recrutamento de leucócitos CX3CR1⁺ para o nervo, raiz ventral e GRD de animais com DECH. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J geneticamente modificados que carregavam um alelo knock-in/knock-out de proteína fluorescente verde monomérica (GFP) de CX3CR1. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença e eutanasiados quando o escore clínico desses animais atingiu entre 9 a 12 pontos e a presença de leucócitos CX3CR1^{GFP+} foi avaliada no GRD torácico, por imunofluorescência.

Com base nos resultados obtidos, a inflamação sistêmica desencadeada pela reação imunológica entre o enxerto e o hospedeiro está afetando o sistema nervoso, corroborando os trabalhos do grupo. A presença de leucócitos, junto com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, no gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinhal, sugere que há uma infiltração significativa nesses tecidos nervosos, contribuindo para uma neuroinflamação.

4.4 Animais submetidos ao modelo de DECH humanizado apresentam acúmulo de leucócitos CD45⁺ no GRD/meninge

O CD45 é um marcador de células hematopoiéticas (células originárias da medula óssea), incluindo a maioria das células do sistema imunológico, como linfócitos, monócitos e neutrófilos. O CD45 é uma proteína tirosina fosfatase presente na superfície dessas células e desempenha um papel importante na ativação de células T e no controle da sinalização intracelular. Sua presença é crucial para distinguir células hematopoiéticas de outras células no corpo, tornando-o um marcador importante em estudos de imunologia e na caracterização da resposta imune, como na DECH (Al BARASHDI et al., 2021).

Com o objetivo de analisar se o desenvolvimento da DECH está relacionado a um acúmulo de leucócitos CD45⁺ no GRD/meninge dos animais, realizamos a indução da DECH humanizada para análise de células CD45⁺ humanas por citometria de fluxo. Após o transplante de PBMCs isolados de sangue periférico de humanos em camundongos NSG, foi realizada análise da quimerização semanalmente, em intervalos de 7 dias (Figura 8 e 9). O experimento durou 28 dias, quando os animais foram eutanasiados porque apresentaram escore entre 9 e 12 (Figura 9A) e atingiram mais de 30% de quimerização (Figura 9B). Dois animais morreram no dia 22 e 25, e não fizeram parte da análise, pois não haviam atingido a quimerização mínima desejada. Entre os dias 07 e 14 não foi observada quimerização.

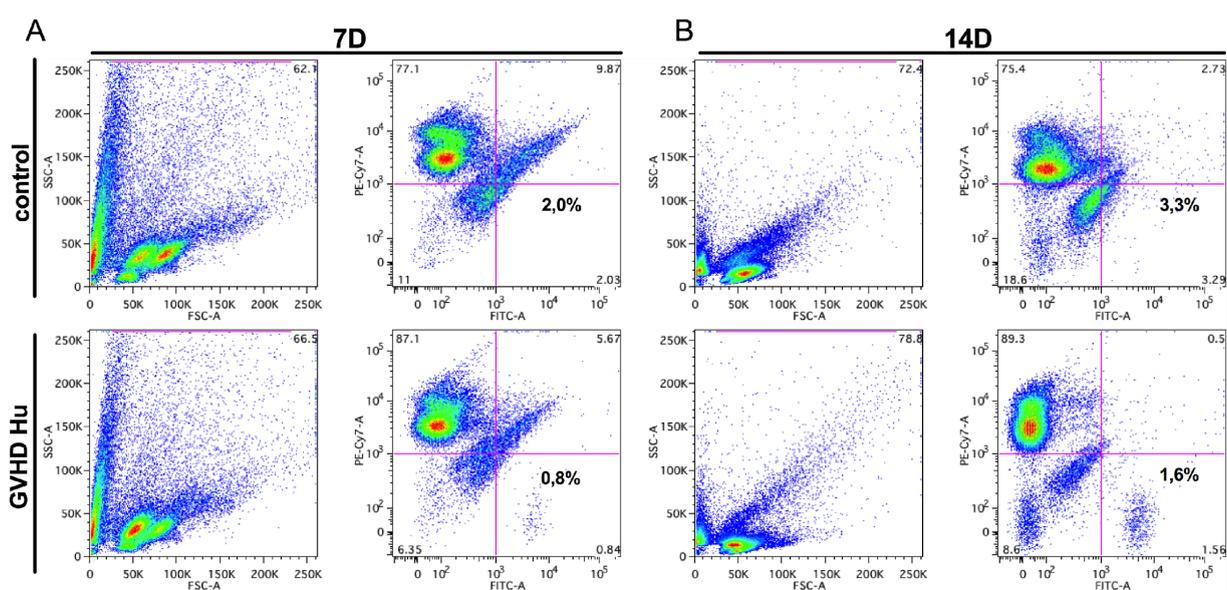


Figura 8. Dot plot representativos da quimerização no modelo de DECH Hu 7 e 14 dias após o transplante. A DECH foi induzida em camundongos humanizados por meio do

transplante de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs). Nos animais da linhagem NSG, a DECH se desenvolveu espontaneamente entre 15 e 28 dias após o transplante, sem a necessidade de irradiação prévia e o grupo controle recebeu apenas salina estéril. Após a indução da DECH, os camundongos foram avaliados semanalmente quanto à quimerização, em intervalos de 7 dias. Eles foram eutanasiados quando a quimerização superou 30% e o escore clínico atingiu entre 9 e 12 pontos. Dot plot representativo da quimerização 7 dias após o transplante (A) e 14 dias após o transplante (B).

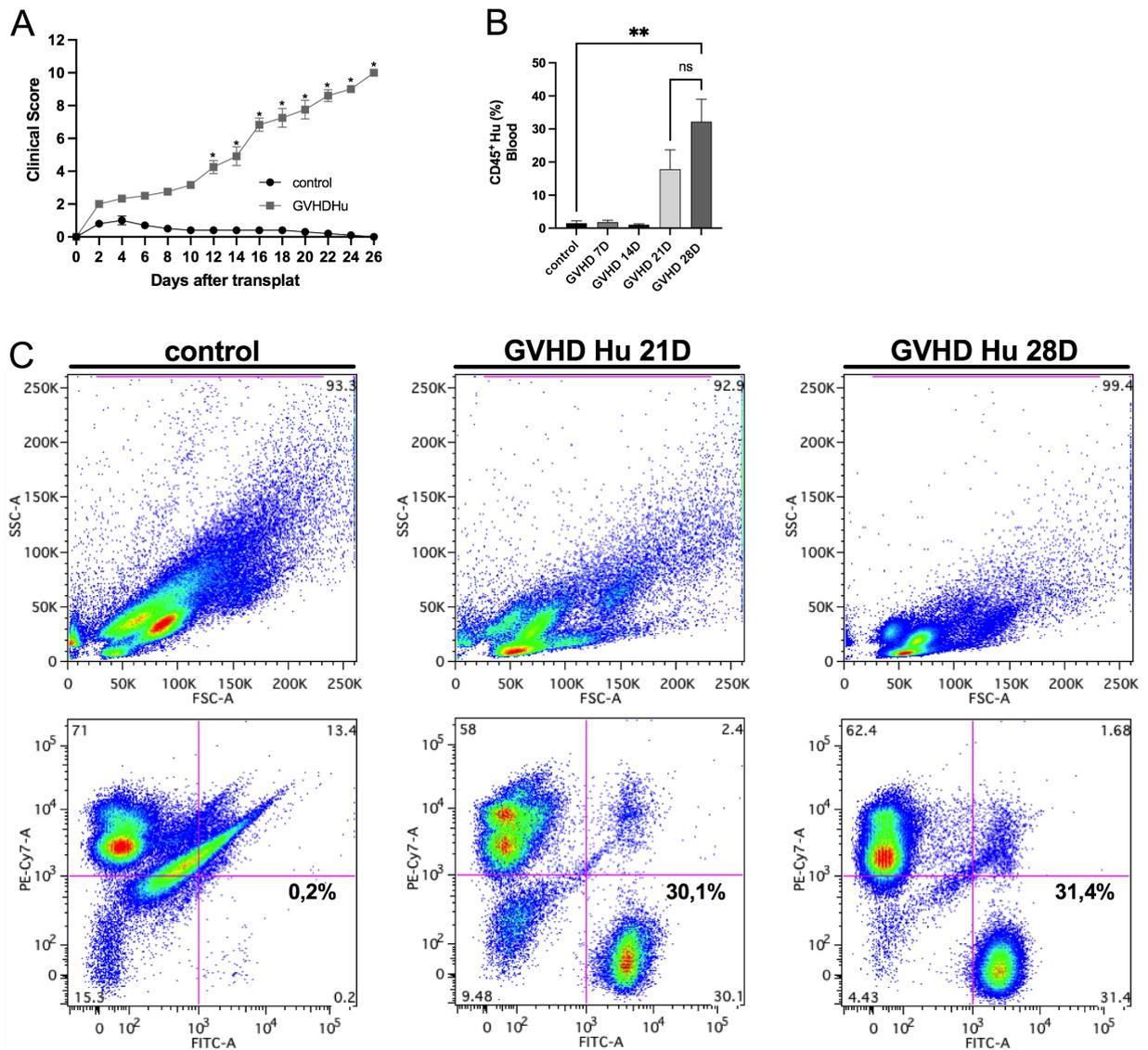


Figura 9. Modelo de DECH Hu apresenta quimerização acima de 30% no sangue 28 dias após o transplante. A DECH foi induzida em camundongos humanizados por meio do transplante de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs). Nos animais da linhagem NSG, a DECH se desenvolveu espontaneamente entre 15 e 28 dias após o transplante, sem a necessidade de irradiação prévia e o grupo controle recebeu apenas salina estéril. Após a indução da DECH, os camundongos foram avaliados semanalmente quanto à quimerização, em intervalos de 7 dias. Eles foram eutanasiados quando a quimerização superou 30% e o escore clínico atingiu entre 9 e 12 pontos. Escore clínico dos animais (A). Frequência de células CD45⁺ no sangue 7D, 14, 21D e 28D após o transplante (B). Dot plot representativos da quimerização 21 e 28 dias após o transplante (C). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 4). *P < 0.05 quando comparados ao grupo DECH.

Uma vez observada a quimerização acima de 30% no modelo de DECH Hu após 28 dias do transplante, os animais foram eutanasiados nesse tempo e os GRDs lombar e torácico, com as meninges desses mesmos segmentos foram retirados e processados para análise da frequência de leucócitos CD45⁺ humanos por citometria de fluxo. Foi observado um acúmulo de leucócitos CD45⁺ Hu na GRD/meninge dos animais do grupo DECH (Figura 10A-B), demonstrando pela primeira vez que estes órgãos podem ser afetados pela resposta inflamatória associada à doença.

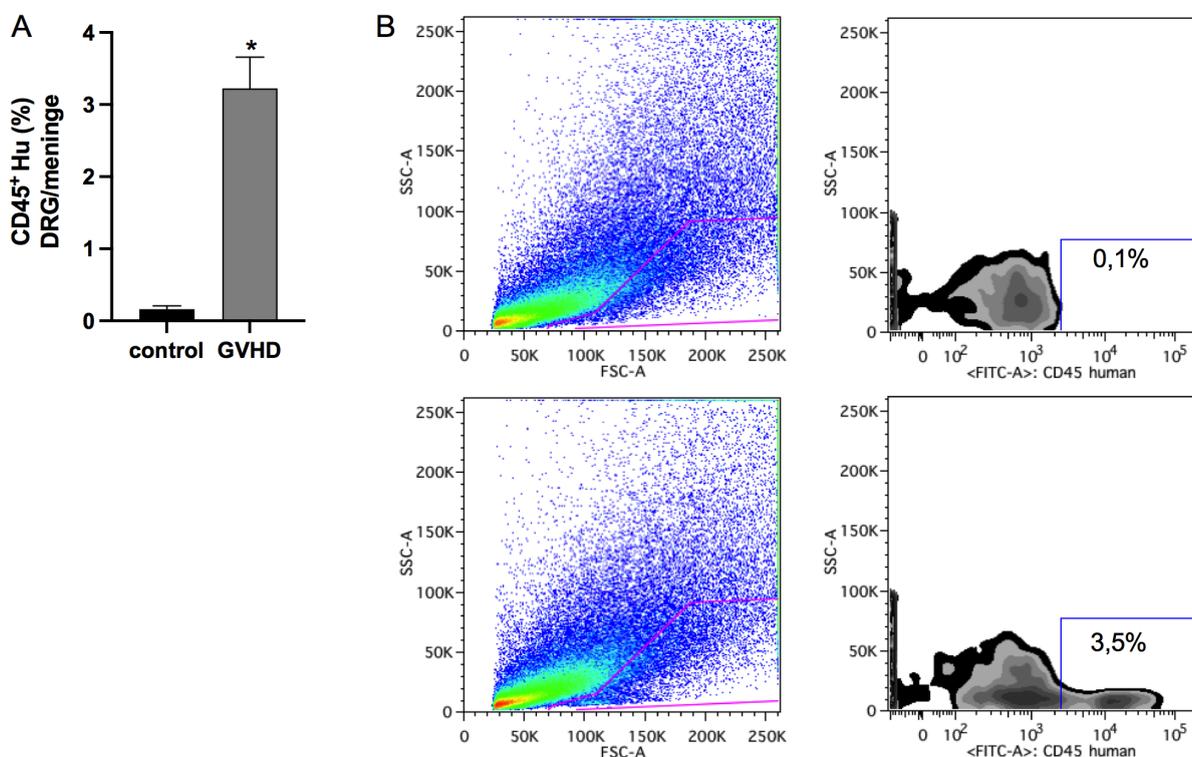


Figura 10. O desenvolvimento da DECH Hu está relacionado a um acúmulo de leucócitos humanos no GRD/meninges. A DECH foi induzida em camundongos humanizados por meio do transplante de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs). Nos animais da linhagem NSG, a DECH se desenvolveu espontaneamente entre 15 e 50 dias após o transplante, sem a necessidade de irradiação prévia e o grupo controle recebeu apenas salina estéril. Após a indução da DECH, os camundongos foram avaliados semanalmente quanto à quimerização, em intervalos de 7 dias. Eles foram eutanasiados quando a quimerização superou 30% e o escore clínico atingiu entre 9 e 12 pontos. Frequência de células CD45⁺ Hu no GRD/meninge 28D após o transplante (A). Dot plot representativos da frequência de células no GRD/meninge 28D após o transplante (B). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 4). *P < 0.05 quando comparados ao grupo DECH.

4.5 Animais submetidos à doença do enxerto-versus-hospedeiro apresentam redução do comportamento locomotor e exploratório

Para testar a hipótese de que a resposta inflamatória observada na medula espinhal, GRD/meninge de camundongos submetidos à DECH poderia causar alterações no comportamento, foi realizada avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos animais. Para tanto, no início dos sinais da doença (11 dias após o transplante) e no início da mortalidade (15 dias após o transplante), os camundongos foram alocados em uma caixa (dividida em quadrados, com marcações no centro, e o espaço entre uma marcação e outra representava 1 centímetro, totalizando 10 quadrados) para serem observados por 5 minutos. O tempo de caminhada (Figura 11A e 11B) e o número de vezes sobre duas patas (Figura 11C e 11D) foi registrado. Posteriormente, foi feita a tabulação em centímetros e somatória do tempo de elevação em duas patas (Figura 11). O total da distância percorrida pelos animais do grupo DECH foi menor, tanto no início dos sinais (Figura 11A) quanto no início da mortalidade (Figura 11C) comparada ao grupo controle. O tempo que os animais ficaram em pé sobre duas patas não apresentou diferença estatística entre os dois grupos no início dos sinais (Figura 11B), entretanto o grupo DECH reduziu o número de vezes que permaneceu sob duas patas, comparado ao grupo controle, no início da mortalidade. Esses resultados indicam que o desenvolvimento da DECH pode estar associado à uma redução do comportamento locomotor e exploratório dos animais.

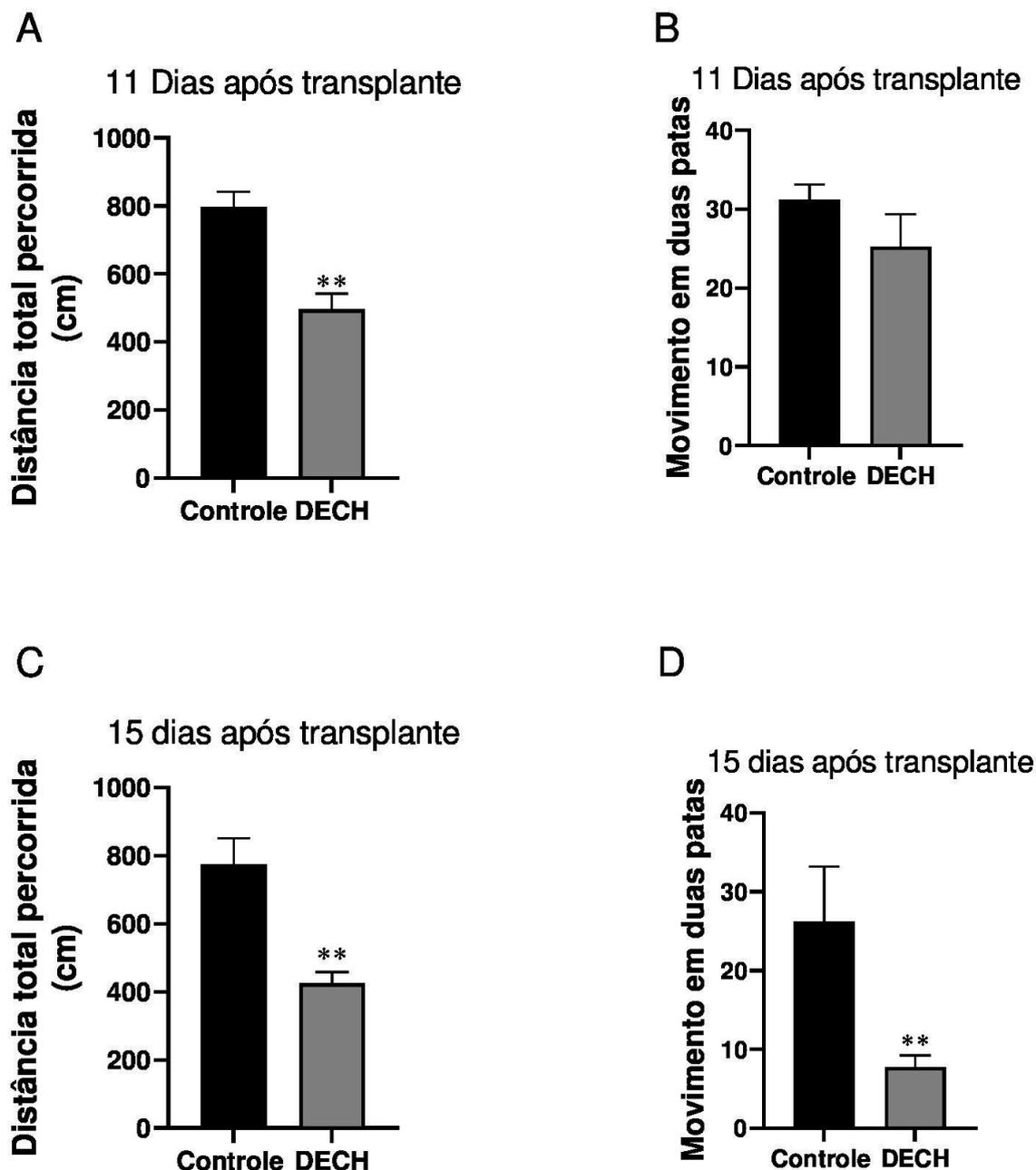


Figura 11. O desenvolvimento da DECH reduz o comportamento locomotor e exploratório dos animais. A DECH foi induzida pelo transplante de esplenócitos e células da medula óssea de camundongos doadores Balb/c para camundongos C57BL/6J. Camundongos que receberam células singênicas, de animais da mesma linhagem, não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo controle. Após a indução da DECH os camundongos foram avaliados de dois em dois dias para análise dos parâmetros clínicos relacionados à doença, e o comportamento foi avaliado no início dos sinais e no início da mortalidade. O teste utilizado foi o de campo aberto, contemplando a distância percorrida, no início dos sinais (A) e no início da mortalidade (B), e o tempo de elevação sob duas patas, no início dos sinais (C) e no início da mortalidade (D). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). *P < 0.05 quando comparados ao grupo DECH.

5. DISCUSSÃO

A DECH é uma complicação grave e potencialmente fatal que resulta da resposta imune das células do doador contra os tecidos do receptor, levando a uma série de reações inflamatórias. A doença ocorre em três fases distintas, a primeira fase, a fase aferente, é marcada por uma resposta inflamatória exagerada que ativa as células apresentadoras de antígenos (APCs), influenciada pelo regime de condicionamento do paciente, que pode incluir radioterapia ou quimioterapia. A seguir, na fase eferente, as células T do doador infundidas interagem com as APCs, promovendo sua ativação e resultando na proliferação e diferenciação dessas células, que secretam citocinas como IL-2 e IFN- γ . A IL-2 amplifica a resposta imune alogênica, ativando outras células T e células NK. A terceira fase, a fase efetora, é caracterizada por uma cascata de efetores celulares e inflamatórios, onde as células T efetoras causam danos aos órgãos-alvo, intensificando a inflamação (NASSEREDDINE et al., 2017; MALARD; HUANG; SIM., 2020).

A migração celular é um componente essencial na patogênese da DECH. As células T efetoras do doador, ao reconhecerem antígenos do hospedeiro, migram para tecidos-alvo, onde causam danos. As células dendríticas do receptor desempenham um papel crucial ao apresentar antígenos e ativar células T do doador, perpetuando a resposta imunológica. Além disso, macrófagos, guiados por quimiocinas como CCL2, IFN- γ e TNF migram para os locais de inflamação, contribuindo para o dano tecidual através da liberação de mediadores inflamatórios (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021; ZHAO; ZHANG; ZHENG, 2021).

A DECH aguda geralmente envolve o trato gastrointestinal (GI) em 74% dos casos, apresentando diarreia, secretora e contínua, apesar do jejum, podendo progredir para se tornar sanguinolenta. A pele é afetada em 70% dos casos, sendo a manifestação cutânea mais comum a erupção cutânea, e o fígado em 44% dos casos, com envolvimento hepático geralmente se manifestando em conjunto com manifestações cutâneas ou gastrointestinais (JUSTIZ; MODI; MOHAMMADI, 2024). No modelo animal, os órgãos alvo e as manifestações são parecidas com aquelas observadas em pacientes, e para avaliar a progressão dos sinais clínicos, relacionada à evolução da doença, foi utilizado um escore clínico que incluiu critérios como perda de peso, atividade, condição da pele e pelagem, presença de diarreia. Este escore foi fundamental para monitorar a gravidade e evolução dos sinais da DECH em animais. Conforme observado na literatura, a curva de sobrevivência acompanhou a graduação clínica da doença, mostrando uma piora progressiva dos sinais clínicos no grupo DECH, enquanto o

grupo controle permaneceu estável (REZENDE et al.; 2017; DUARTE et al., 2022). Recentemente o envolvimento do sistema nervoso central e periférico passou a ser objeto de pesquisa relacionado à DECH. Esse interesse surgiu com base na clínica, com relatos de disfunção cognitiva, neuropatia craniana e convulsão (LI et al., 2021). O sistema nervoso central está sendo analisado por outros membros do nosso grupo de pesquisa, desta forma a ênfase neste trabalho foi o sistema nervoso periférico. Foi observado um aumento significativo de CXCL1, IL-1 β e IFN- γ na medula espinhal, e de IL-1 β , IFN- γ e CCL2 no GRD.

A CXCL1, uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel importante na regulação da resposta imune e na inflamação. Na DECH, a CXCL1 é secretada em resposta à ativação das células T, mastócitos e células endoteliais, atuando como um potente quimioatraente para neutrófilos (BOUAZZAOUI et al., 2009; COOKE; COGHILL; SERODY, 2019). Neutrófilos, orientados por quimiocinas como a CXCL1, deslocam-se para os tecidos do hospedeiro nos locais de inflamação, onde promovem dano tecidual através da liberação de mediadores inflamatórios. O modelo de dor inflamatória, induzido por injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (CFA), é empregado para investigar os mecanismos relacionados à dor inflamatória e sua modulação. Esse modelo gera uma inflamação intensa, possibilitando a análise de mediadores envolvidos tanto na sensibilização periférica quanto na central. Nesse cenário, a quimiocina CXCL1 tem se destacado como um mediador essencial (CAO et al., 2014).

O CXCL1 atua principalmente aumentando a transmissão sináptica excitatória em neurônios espinhais, um processo que intensifica a percepção da dor inflamatória. Este aumento está associado à maior ativação do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), essencial para a plasticidade sináptica e a sensibilização central, mecanismos fundamentais na persistência e amplificação da dor. Além disso, a quimiocina CXCL1 eleva a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) em neurônios da medula espinhal. A COX-2 é uma enzima-chave na produção de prostaglandinas inflamatórias, que contribuem para a perpetuação da dor e da inflamação. Esse efeito ocorre por meio da ativação do receptor de quimiocina CXCR2, reforçando o papel do eixo CXCL1/CXCR2 na regulação da dor inflamatória (CAO et al., 2014).

O receptor 2 do motivo C-C das quimiocinas (CCR2) é o principal receptor do CCL2. Esse receptor é amplamente expresso em GRD e Ma et al. (2020), no modelo de desmielinização do nervo ciático, demonstrou que existe uma regulação positiva de CCR2 após inflamação periférica. CCL2 pode atuar diretamente sobre os neurônios sensoriais no gânglio

da raiz dorsal (GRD), modulando a resposta de cálcio intracelular. Estudos indicam que esta quimiocina ativa receptores CCR2 nos neurônios do GRD, o que resulta em um aumento dos níveis de cálcio intracelular, contribuindo para a sensibilização neuronal e alterações na percepção sensorial (Zhang et al., 2013). Além disso, no corno dorsal da medula espinhal, CCL2 pode aumentar a atividade pré-sináptica, modulando a liberação de neurotransmissores e impactando a transmissão nociceptiva. O trabalho de Ma et al. (2020) demonstrou que a injeção de antagonistas de CCR2 no forame intervertebral inibe a dor inflamatória mediada por CCL2, sugerindo uma via terapêutica promissora para o controle da dor. Por fim, a presença de quimiocinas como CCL2 pode influenciar o recrutamento de leucócitos na medula espinhal e no GRD, um aspecto investigado em experimentos em andamento pelo nosso grupo. O estudo da dor na doença do enxerto contra o hospedeiro é ainda limitado, mas representa uma perspectiva futura para desdobramentos deste trabalho.

O aumento de IL-1 β no GRD e na medula espinhal é outro dado relevante que foi obtido neste trabalho, porque esta citocina também medeia a resposta inflamatória e aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando a migração de células imunológicas para os tecidos afetados (ZHENG et al., 2024) e podem se correlacionar com o dado de aumento de leucócitos no GRD observado pela imunofluorescência e citometria de fluxo.

O IFN- γ é conhecido por sua capacidade de ativar a micróglia na medula espinhal e no GRD (QIN et al., 2023; TAN et al., 2021). Essa citocina amplifica a resposta imune na DECH ao intensificar a ativação de células T alorreativas e a polarização para um perfil Th1, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Ele aumenta a expressão de moléculas do MHC em células apresentadoras de antígenos, ampliando o reconhecimento imunológico e a inflamação tecidual. Além disso, o IFN- γ estimula a produção de quimiocinas como CXCL9 e CXCL10, atraindo leucócitos para os tecidos-alvo, onde promove dano por meio da ativação de macrófagos e neutrófilos e da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Desta forma, também prejudica a integridade das barreiras epiteliais e endoteliais, facilitando a infiltração inflamatória, enquanto induz apoptose celular via vias como Fas-FasL. Esses efeitos tornam o IFN- γ um mediador chave na intensificação da DEHC, contribuindo para o dano tecidual severo que caracteriza a doença. (ZHAO; ZHANG; ZHENG, 2021.).

Assim, o aumento da expressão dessas citocinas e quimiocinas que foi observado, pode ser importante para estimular a migração celular e a amplificação da resposta inflamatória,

desempenhando um papel crítico na progressão da DECH e nos danos subsequentes aos tecidos do hospedeiro.

O gânglio da raiz dorsal possui um suprimento sanguíneo abundante, garantido por plexos arteriais superficiais e profundos interconectados, derivados das artérias segmentares. Sua alta permeabilidade vascular, em comparação ao restante do sistema nervoso periférico, estabelece uma interface sangue-nervo menos restritiva. Essa característica facilita o transporte de nutrientes e metabólitos, mas também aumenta a vulnerabilidade do GRD a neurotóxicos e metabólitos tóxicos, especialmente em condições como neuropatias induzidas por drogas. Além disso, essa permeabilidade elevada pode favorecer o influxo de células imunes, como leucócitos, no GRD e nas raízes nervosas adjacentes em resposta a processos inflamatórios ou lesões, conforme observado por Watkins e Maier (2002) e Ahimsadasan et al. (2022). O acúmulo de leucócitos na raiz ventral e no nervo do GRD lombar indica uma resposta inflamatória ativa. Essa inflamação pode resultar em dor neuropática e disfunção neurológica, sendo um reflexo de processos patológicos que envolvem a ativação do sistema imunológico na área. A raiz ventral, por sua vez, transmite sinais motores para os músculos, controlando o movimento voluntário, enquanto o GRD lombar conduz informações sensoriais, como dor e temperatura, para o SNC. Lesões ou inflamações nessas áreas podem causar disfunção motora, sensorial e dor crônica, afetando a qualidade de vida (PURVES, D. et al., 2001; WATHINS; MAIER, 2002; AHIMSADASAN et al., 2022). Neste estudo, foi verificado a presença de células CX3CR1^{GFP/GFP} transplantadas para animais irradiados ocupando tanto a região rica em fibras do GRD, especificamente a raiz ventral, além do nervo periférico de animais doentes. Apesar do efeito dessas células não ter sido explorado no presente trabalho, sua presença nos referidos componentes anatômicos sugere que elas podem gerar prejuízos funcionais relacionados à capacidade motora e da função simpática nos órgãos alvos do trato gastrointestinal e da pele. Além disso, é possível que a inflamação do nervo periférico contribua para o desenvolvimento de uma resposta dolorosa aberrante na DECH, aspecto que merece maior atenção nos cuidados à beira leito.

Nos gânglios sensoriais, existem macrófagos residentes conhecidos como macrófagos associados a neurônios sensoriais (sNAMs) (KISHIMOTO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2022.). O CX3CR1, um receptor de quimiocina, também conhecido como receptor de fractalcina, expresso em várias células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos e alguns tipos de células nervosas, é fundamental para a interação entre macrófagos e neurônios sensoriais, facilitando a comunicação entre esses macrófagos e as células nervosas

(GIRARD et al., 2021; JUNG et al., 2023). A presença e a ativação do CX3CR1 em macrófagos e outras células associadas a neurônios sensoriais podem estar relacionadas à inflamação nos gânglios sensoriais (KISHIMOTO, T. et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2022; HALLER, H. et al., 2020). No experimento de imunofluorescência, foram utilizados camundongos reporter Cx3cr1GFP/GFP como animais doadores, revelando uma presença massiva de células CX3CR1 no parênquima do GRD torácico de animais doentes. Observou-se que essa maior quantidade de células CX3CR1 transplantadas se concentrou em uma região específica do GRD, onde a arquitetura normal foi perdida. Esse fenótipo pode estar relacionado à dor visceral observada em pacientes com a DECH, sendo também uma possível consequência das lesões no sistema gastrointestinal, que são comuns nessa doença (OGGERO et al., 2022; WANG et al., 2023).

A CD45, conhecida como antígeno comum de leucócitos, é amplamente utilizada como um marcador para identificar e distinguir células do sistema imunológico, especialmente leucócitos, em diversos tecidos. Por ser expressa em quase todas as células hematopoiéticas, a CD45 é um marcador confiável para caracterizar a presença de leucócitos, incluindo células T, células B, monócitos e outros tipos de células imunológicas (COURTNEY et al., 2019). Dentro dessa perspectiva, neste trabalho foi analisada a presença de leucócitos CD45⁺ no GRD e meninges associadas, no modelo humanizado de DECH e foi observado um aumento dessas células 28 dias após o transplante. O acúmulo de células CD45⁺ no GRD e nas meninges sugere uma infiltração de linfócitos T e outras células do sistema imunológico no sistema nervoso central e periférico. Esse acúmulo pode estar associado a uma resposta inflamatória persistente (FISHER et al., 2022; RAOOF et al., 2021).

Uma vez confirmada uma resposta inflamatória aumentada no GRD e medula espinhal de camundongos submetidos à DECH, nós buscamos compreender se esse fenômeno poderia interferir no comportamento dos animais e para isso, utilizamos o teste de campo aberto. O teste do campo aberto (OFT) é um teste que pode ser utilizado para analisar comportamento, em que é observado o comportamento exploratório e atividade geral em camundongos, onde tanto a qualidade quanto a quantidade da atividade podem ser medidas (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Foi observada alteração do comportamento locomotor e exploratório dos animais, corroborando outros trabalhos que mostraram que na DECH aguda pode ocorrer aprendizagem espacial e memória prejudicadas, ansiedade aumentada, memória de reconhecimento prejudicada e comportamento exploratório reduzido (ADAMS et al., 2022), entretanto não correlacionam com resposta inflamatória no GRD ou medula espinhal.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou, pela primeira vez, que a DECH desencadeia uma resposta inflamatória na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal, caracterizada pelo aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além do acúmulo de leucócitos nesses órgãos. Essa inflamação impactou significativamente o comportamento dos camundongos afetados pela doença. Ao identificar esses órgãos como possíveis alvos da DECH, abrimos novas perspectivas para o manejo clínico, possibilitando no futuro intervenções mais precisas para pacientes que apresentem sinais e sintomas de comprometimento do sistema nervoso.

7. REFERÊNCIA

ADAMS, R. C. et al. Donor bone marrow–derived macrophage MHC II drives neuroinflammation and altered behavior during chronic DECH in mice. **Blood**, v. 139, n. 9, p. 1389–1408, 3 mar. 2022.

AHIMSADASAN, N.; REDDY, V.; KHAN SUHEB, M. Z. et al. Neuroanatomy, Dorsal Root Ganglion. In: **STATPEARLS [Internet]**. Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls; 2024.

ALBANESE, A. et al. Early breakthrough T cell proliferation despite CNI/MTX prophylaxis is a harbinger of Acute GvHD (AGVHD) and is controlled by Abatacept: mechanism of success of the ABA2 AGvHD Prevention Trial. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 274-275, nov. 2022.

AL BARASHDI, M. A et al.. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). **J Clin Pathol**. 2021 Sep;74(9):548-552. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206927. Epub 2021 May 26. PMID: 34039664; PMCID: PMC8380896.

ALEXANDER, K. A. et al. CSF-1–dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 10, p. 4266–4280, 26 ago. 2014.

ALSUKHON, J. et al. Severe combined immunodeficiency—a purine metabolism disorder. **Pediatric Medicine**, v. 1, n. 0, 28 nov. 2018.

BERNARDES, P.T. et al.. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. **PLoS One**. Apr 13;10(4):e0123004, 2015

BILLERBECK, E. et al. Humanized mice efficiently engrafted with fetal hepatoblasts and syngeneic immune cells develop human monocytes and NK cells. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 2, p. 334-343, 2016.

BOUAZZAOUI et al. Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 8, p. 687–701, 2 jul. 2009. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.49>

BRAUN, L. M.; ZEISER, R. Immunomodulatory therapies for the treatment of graft-versus-host disease. **HemaSphere**, v. 5, n. 6, p. e581, jun. 2021.

BRODERICK, L.; HOFFMAM, H.M. IL-1 and autoinflammatory disease: biology, pathogenesis and therapeutic targeting. **Nat Rev Rheumatol** **18**, 448–463 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00797->

CAO, D.L. et al. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2. **Exp Neurol**. 2014 Nov;261:328-36. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.014. Epub 2014 May 20. PMID: 24852102; PMCID: PMC4194227.

CASTOR, M. G et al.. Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. **J Leukoc Biol**. 91(4):629-39, 2012.

CHAKRABORTY, R. K.; BURNS, B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. [Updated 2023 May 29]. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>

CHEN, B. J. Chronic GVHD of the CNS. **Blood**, v. 139, n. 9, p. 1271-1272, mar. 2022.

CHEN, Y. B. et al. RGI-2001 infusion for prevention of acute GvHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 1877-1878, nov. 2022.

COOKE, K.R et al.. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. **J Clin Invest**. 107(12):1581-9, 2001.

COSTANZO, V.; COSTANZO, M. Intravital imaging with two-photon microscopy: A look into the kidney. **Photonics**, v. 9, n. 5, p. 294, abr. 2022.

COURTNEY, A. H. et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. **Sci Signal**, v. 12, n. 604, p. eaaw8151, 22 out. 2019. doi: 10.1126/scisignal.aaw8151.

DECIMO, I. et al. Meninges: A Widespread Niche of Neural Progenitors for the Brain. **Neuroscientist**, v. 27, n. 5, p. 506-528, 2021. doi: 10.1177/1073858420954826.

DEVINE, S. M. et al. Low risk of chronic graft-versus-host disease and relapse associated with T cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia in first remission: results of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network protocol 0303. **Biol Blood Marrow Transpl**, v. 17, p. 1343-1351, 2011.

DULERY, R. et al. Reduced post-transplant cyclophosphamide dose associated with antithymocyte globulin in peripheral blood stem cell haploidentical transplantation. **Blood**, 2022.

DUARTE, L.R.F. et al.. Resolution of Inflammation in Acute Graft-Versus-Host-Disease: Advances and Perspectives. **Biomolecules**. 2022 Jan 5;12(1):75. doi: 10.3390/biom12010075. PMID: 35053223; PMCID: PMC8773806.

EHX, G. et al. Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease in Humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHD Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1943, ago. 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01943.

FERRARA, J. L. M. et al. Graft-versus-host disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1550-1561, maio 2009.

FISHER, E.S. et al. Single cell profiling of CD45+ spinal cord cells reveals microglial and B cell heterogeneity and crosstalk following spinal cord injury. **J Neuroinflammation** 19, 266 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02627-3>.

GAJTKÓ, A. et al. IL-1 β Induced Cytokine Expression by Spinal Astrocytes Can Play a Role in the Maintenance of Chronic Inflammatory Pain. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 16 nov. 2020.

GANAPATHY, M. K.; REDDY, V.; TADI, P. Neuroanatomy, Spinal Cord Morphology. [Updated 2022 Oct 24]. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545206/>

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 1, p. 153-156, mar. 2015.

GOOPTU, M. et al. HLA haploidentical versus matched unrelated donor transplants with post-transplant cyclophosphamide based prophylaxis. **Blood**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2021.

GUIMARÃES, R. M. et al. Sensory neuron-associated macrophages proliferate in the sensory ganglia after peripheral nerve injury in a CX3CR1 signaling dependent manner. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 24 mar. 2022.

HALLER, H. et al. CX3CR1 is required for the maintenance of dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nature Communications**, v. 11, p. 264, 2020. DOI: 10.1038/s41467-019-13839-2. Disponível em: www.nature.com/naturecommunications.

HENIG, I.; ZUCKERMAN, T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 5, n. 4, e0028, 29 out. 2014. doi: 10.5041/RMMJ.10162. PMID: 25386344; PMCID: PMC4222417.

HILL, L. et al. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 9, n. 1, p. 21-46, nov. 2017.

HOWARD, J. G.; WOODRUFF, M. F. A. Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. **Proc. R. Soc. Lond**, n. 154, p. 532-539, 1961.

JANG, K.; GARRAWAY, S. M. A review of dorsal root ganglia and primary sensory neuron plasticity mediating inflammatory and chronic neuropathic pain. **Neurobiology of Pain**, v. 15, p. 100151-100151, 1 jan. 2024.

JANSEN, S. A. et al. Challenges and opportunities targeting mechanisms of epithelial injury and recovery in acute intestinal graft-versus-host disease. **Mucosal Immunol**, v. 15, p. 605-619, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00527-6>.

JIANG, J. et al. Ketogenic diet alleviates cognitive dysfunction and neuroinflammation in APP/PS1 mice via the Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways. **Neural Regen Res**. 2023 Dec;18(12):2767-2772. doi: 10.4103/1673-5374.373715. PMID: 37449643; PMCID: PMC10358659.

JIANG et al. T Cell Subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor. **Front Immunol**. 2021 Oct 5;12:761448. doi: 10.3389/fimmu.2021.761448. PMID: 34675938; PMCID: PMC8525316.

JI, R. R.; DONNELLY, C. R.; NOCELLI, L. Neuroinflammation and central sensitization in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 43–55, 2013.

JIMENEZ-ANDRADE, J. M. et al. Vascularization of the Dorsal Root Ganglia and Peripheral Nerve of the Mouse: Implications for Chemical-Induced Peripheral Sensory Neuropathies. **Molecular Pain**, v. 4, p. 1744–80694–10, jan. 2008.

JOUKAL, M.; KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVÝ, P. Direct communication of the spinal subarachnoid space with the rat dorsal root ganglia. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 205, p. 9–15, maio 2016.

JULLIEN, M. et al. Addition of ATG to Clofarabine-Based reduced intensity conditioning regimen with PBSC and ptcy in adults with myeloid malignancies. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 10451-10452, nov. 2022.

JUNIOR, L.S.B et al. The anatomy of the brain - learned over the centuries. **Surg Neurol Int**. 2021 Jun 28;12:319. doi: 10.25259/SNI_200_2021. PMID: 34345460; PMCID: PMC8326080.

JUSTIZ, A.A.V.; MODI, P.; MOHAMMADI, O. Graft-Versus-Host Disease. [Updated 2024 Jun 7]. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>

KAWAMURA, N. et al. Brain fractalkine-CX3CR1 signalling is anti-obesity system as anorexigenic and anti-inflammatory actions in diet-induced obese mice. **Sci Rep** 12, 12604 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16944-3>

KEAN, L. S. et al. A real-world evidence comparison of 1-year overall survival and relapse-free survival between patients treated with abatacept in combination with a calcineurin inhibitor and methotrexate versus antithymocyte globulin or post-transplant cyclophosphamide following allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 1373-1375, nov. 2022.

KRENGER,W; FERRARA, J.L. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res.* 1996;15(1):50-73. doi: 10.1007/BF02918284. PMID: 8739565.

KISHIMOTO, T. et al. Sensory neuron-associated macrophages and their role in sensory ganglia. **Blood**, v. 112, p. 3456-3462, 2008. DOI: 10.1182/blood-2008-07-170787.

KRAEUTER, A.K.;GUEST, P.C.;SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods Mol Biol.** 2019;1916:99-103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9. PMID: 30535687.

LEE, M. et al. Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. **Immune Netw.** 2018 Jan 25;18(1):e5. doi: 10.4110/in.2018.18.e5. PMID: 29503738; PMCID: PMC5833124.

LI, M. et al. A Case Report of Central Nervous System Graft-Versus-Host Disease and Literature Review. **Front Neurol.** 2021 Mar 10;12:621392. doi: 10.3389/fneur.2021.621392. PMID: 33776885; PMCID: PMC7987907.

MA, S. B. et al. CCL2 facilitates spinal synaptic transmission and pain via interaction with presynaptic CCR2 in spinal nociceptor terminals. **Molecular Brain**, v. 13, p. 161, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13041-020-00701-6.

MALARD, F.; HUANG, X. J.; SIM, J. P. Y. Treatment and unmet needs in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. **Leukemia**, v. 34, n. 5, p. 1229-1240, maio 2020.

MALARD, F. et al. Acute graft-versus-host disease. **Nat Rev Dis Primers** 9, 27 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00438-1>

McCURDY, S. R. et al. Development of grade II acute graft-versus-host disease is associated with improved survival after myeloablative HLA-matched bone marrow transplantation using single-agent post-transplant cyclophosphamide. **Biol Blood Marrow Transpl**, v. 25, p. 1128-1135, 2019.

MEI, J. et al. Automated radial 8-arm maze: A voluntary and stress-free behavior test to assess spatial learning and memory in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 381, p. 112352, mar. 2020.

MURTAZINA, A.; ADAMEYKO, I. The peripheral nervous system. **Development**, v. 150, n. 9, dev201164, 1 maio 2023. doi: 10.1242/dev.201164. Epub 2023 maio 12. PMID: 37170957.

NASSEREDDINE, S. et al. (2017). Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. **Anticancer Research**. 37. 1547-1555. 10.21873/anticancer.11483.

NIKOLIC, B. et al. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. **J Clin Invest**. 2000 May;105(9):1289-98. doi: 10.1172/JCI7894. PMID: 10792004; PMCID: PMC315439.

OGGERO, S. et al. Dorsal root ganglia CX3CR1 expressing monocytes/macrophages contribute to arthritis pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 106, p. 289-306, nov. 2022. DOI: 10.1016/j.bbi.2022.09.008. Epub 14 set. 2022.

OLIAI, C. et al. Precision-engineered cell therapy Orca-T demonstrates high relapse-free survival at 1 year while reducing graft-versus-host disease and toxicity. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 654-656, nov. 2022.

OLIVEIRA, G. et al. Wild mouse & laboratory mouse historical aspects, genetic selection and welfare. 2020.

PARAMEL MOHAN, S.; RAMALINGAM, M. Neuroscience of Peripheral Nerve Regeneration. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 13, Suppl 2, p. S913-S916, nov. 2021. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_182_21. Epub 2021 nov. 10. PMID: 35017897; PMCID: PMC8686930.

PATEL, D. A. et al. Mouse models of graft-versus-host disease. **Methods in Cell Biology**, p. 41-66, 1 jan. 2022.

PURVES, D. et al., editors. Neuroscience. 2nd edition. **Sunderland (MA): Sinauer Associates**; 2001.

QIN, J. et al. Microglia activation in central nervous system disorders: A review of recent mechanistic investigations and development efforts. **Frontiers in Neurology**, v. 14, 7 mar. 2023.

RAMADAN, A.; PACZESNY, S. Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 14, 2015.

RAOOF, R. et al. Dorsal Root Ganglia Macrophages Maintain Osteoarthritis Pain. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 39, p. 8249–8261, 29 set. 2021.

REZENDE, B.M. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase alleviates graft-versus-host disease. **J Exp Med**. 2017 Nov 6;214(11):3399-3415. doi: 10.1084/jem.20170261. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28947611; PMCID: PMC5679175.

REZENDE, B. et al. Lithothamnion muelleri Controls Inflammatory Responses, Target Organ Injury and Lethality Associated with Graft-versus-Host Disease in Mice. **Mar. Drugs** , 11, 2595-2615, 2013.

RUGGIU, M. et al. Case report. **Medicine**, v. 96, n. 42, p. e8303-e8303, out. 2017.

SALHOTRA, A. et al. Orca-Q demonstrates favorable GvHD-and-relapse-free survival in haploidentical transplants without post-transplant cyclophosphamide. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 1865-1866, nov. 2022.

SAXTON, R.A.; GLASSMAN, C.R.; GARCIA,K.C. Emerging principles of cytokine pharmacology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**. 2023 Jan;22(1):21-37. doi: 10.1038/s41573-022-00557-6. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36131080; PMCID: PMC10292932.

SCHEURER, J. et al. Modeling acute graft-versus-host disease (aDECH) in murine bone marrow transplantation (BMT) models with MHC disparity. **Methods Cell Biol**. 2022;168:19-39. doi: 10.1016/bs.mcb.2021.12.007. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35366982.

SHIMONI, A. et al. The association of graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease in haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide for AML. **Bone Marrow Transplant**, v. 57, p. 384-390, 2022.

SINGH, V.; KAUR, R.; KUMARI, P.; PASRICHA, C.; SINGH, R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. **Clin Chim Acta**, v. 548, p. 117487, 1 ago. 2023. doi: 10.1016/j.cca.2023.117487. Epub 2023 jul. 11. PMID: 37442359.

SPYROU, N.; LEVINE, J. E.; FERRARA, J. L. M. Acute GVHD: New approaches to clinical trial monitoring. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 35, n. 4, p. 101400, dez. 2022.

SUMMERS, C.; SHETH, V. S.; BLEAKLEY, M. Minor histocompatibility antigen-specific T cells. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, p. 284, jun. 2020.

TANG, L. et al. Post-transplant cyclophosphamide versus anti-thymocyte globulin in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1071268, 2023.

TATEM et al. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **J Vis Exp**. 2014 Sep 29;(91):51785. doi: 10.3791/51785. PMID: 25286313; PMCID: PMC4672952.

TESHIMA, T.; HILL, G. R. The pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease: Lessons learnt from animal models. **Frontiers in Immunology**, v. 12, ago. 2021.

THAU, .; REDDY, V.; SINGH, P. Anatomy, Central Nervous System. [Updated 2022 Oct 10]. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/>

TOUBAI, T, et al. Danger Signals and Graft-versus-host Disease: Current Understanding and Future Perspectives. **Front Immunol**. 2016 Nov 29;7:539. doi: 10.3389/fimmu.2016.00539. PMID: 27965667; PMCID: PMC5126092.

VINNAKOTA, J. M.; ZEISER, R. Acute graft-versus-host disease, infections, vascular events and drug toxicities affecting the central nervous system. **Frontiers in Immunology**, v. 12, out. 2021.

VOROBYEV, V. I. et al. Abatacept/tacrolimus or abatacept/tacrolimus/post-transplant cyclophosphamide are safe and highly effective in preventing graft-versus-host disease in matched or mismatched donor peripheral blood stem cell transplantation. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 7622-7623, nov. 2022.

VÕIKAR, V., STANFORD, S.C. (2023). The Open Field Test. In: Harro, J. (eds) Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders. **Neuromethods**, vol 190. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_2

VRIESENDORP, H. M.; HEIDT, P. J. History of graft-versus-host disease. **Experimental Hematology**, v. 44, n. 8, p. 674-688, ago. 2016.

WANG, Xueting et al. CX3CL1/CX3CR1 signal mediates M1-type microglia and accelerates high-altitude-induced forgetting. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 17, 2023. DOI: 10.3389/fncel.2023.1189348. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1189348>. Acesso em: 24 nov. 2024.

WATHINS, L. R.; MAIER, S. F. (2002). Beyond neurons: Evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, 82(4), 981-1011.

WILKINSON, A. N. et al. IL-6 dysregulation originates in dendritic cells and mediates graft-versus-host disease via classical signaling. **Blood**, v. 134, n. 23, p. 2092-2106, dez. 2019.

WOFFORD, K et al. Neuroimmune Interactions and Immunoengineering Strategies in Peripheral Nerve Repair. **Progress in Neurobiology**, 2021.

XIE, W. et al. *Neuroscience*. 2012 Mar 29;206:212-23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.007. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22265726; PMCID: PMC3294034.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. Acute graft-versus-host disease — Biologic process, prevention, and therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 22, p. 2167-2179, nov. 2017.

ZHANG, Z.J. et al. Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. **Pain**. 2013. doi: 10.1016/j.pain.2013.07.002. Epub 2013 Jul 4. PMID: 23831863; PMCID: PMC3899784.

ZHANG, Y.L. et al. Mesenchymal Stem Cells Enhance Chemotaxis of Activated T Cells through the CCL2-CCR2 Axis In Vitro. **Bull Exp Biol Med** 172, 263–269 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05373-3>

ZHAO, C.; ZHANG, Y.; ZHENG, H. The Effects of Interferons on Allogeneic T Cell Response in DECH: The Multifaced Biology and Epigenetic Regulations. **Frontiers in immunology**, v. 12, 8 jul. 2021.

ZHENG, D.;LIWINSKI, T.; ELINAVI, E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. **Cell Discov** 6, 36 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>

ZHENG, Y. N et al. Role of Exercise on Inflammation Cytokines of Neuropathic Pain in Animal Models. **Mol Neurobiol** (2024). <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04214-4>.