UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS COELHO MARLIÉRE ARRUDA

**Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-
tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e
esclerose múltipla**

Ribeirão Preto

2013

LUCAS COELHO MARLIÉRE ARRUDA

Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Arruda, Lucas Coelho Marlière

Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla Ribeirão Preto, 2013.

130 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Farias, Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de

1. autoimunidade 2. diabetes *mellitus* tipo 1 3. esclerose múltipla 4. transplante de células-tronco hematopoéticas 5. reconstituição imunológica.

Esta dissertação recebeu fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 135889/2011-1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Coelho Marlière Arruda

Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Wâner e Nilza, com eterna gratidão

À Clarice, com carinho

À memória do Professor Júlio César Voltarelli

Aos pacientes transplantados,

Doutores na arte da vida,
que incansáveis, tornam o desejo de luta maior que o próprio medo
que sedentos de vida, assumem por ela todos os riscos,
o risco mesmo de perdê-la.

Com vocês, estamos sempre aprendendo
que a luta, nem sempre seguida de vitória,
é o que importa e torna preciosa nossa efêmera existência.

Aos que vitoriosos alcançaram o objetivo de viver,
Aos que persistentes continuam lutando,
Aos que perderam a batalha, mas engrandeceram seu espírito
e deixaram em nossa memória a lembrança de sua coragem.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Deus, causa primária de todas as coisas e fonte de força e inspiração;

Aos meus pais, Wâner e Nilza, pela força, apoio e incentivo. À minha irmã, Clarice, pelo carinho. Sem vocês nada disso seria possível, todo o esforço, trabalho e confiança foram fundamentais na minha formação como pessoa, e agora como “cientista”. Aos meus tios, primos e familiares, que sempre me apoiaram, principalmente nos momentos mais difíceis;

À Prof.^a Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, pela oportunidade, confiança e por ser mais do que uma orientadora, dando-me aprendizados que irei levar para toda a minha vida pessoal e acadêmica. Muito obrigado por tudo;

Ao Prof. Dr. Júlio César Voltarelli, pela oportunidade única, e que, apesar do pouco convívio, me deixou profundos ensinamentos sobre pesquisa científica e humildade;

À diretoria científica e administrativa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em cujos laboratórios esse trabalho foi desenvolvido. Em especial ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, que muito me apoiou durante esses anos e nunca mediu esforços para a realização desse projeto;

Agradecimento especial ao Laboratório de Citometria de Fluxo, em especial à Patrícia, Carmen, Daiane e Camila, pela paciência e trabalho árduo durante todos esses anos para a realização desse projeto;

Ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, em especial ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela oportunidade e apoio;

À Ana, secretária da pós-graduação, pela dedicação aos alunos da imuno e presteza em todos os momentos;

À Universidade de São Paulo, pelo ensino público de qualidade e vanguarda na pesquisa científica no país;

À Finep, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização desse projeto;

À unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas, pelo empenho no tratamento dos pacientes, inovação científica e simpatia de todos os funcionários;

Aos médicos do TMO, Setor de Doenças Neuromusculares e a Divisão de Endocrinologia e Metabolismo do HCFMRP, Dr^a Belinda Simões Pinto, Dr^a Beatriz Stracieri, Dr. Fabiano Pieroni, Dr. Carlos Eduardo Barra Couri, Dr^a Daniela Moraes. Em especial à Prof^a Dr^a Maria Carolina Oliveira e à todos os funcionários responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes e coleta das amostras;

Aos pacientes transplantados pela confiança na equipe médica e doação do material necessário para a realização do projeto;

Aos pacientes-controles que participaram desse projeto, pois sem esses a pesquisa não seria possível;

À todos os amigos do Laboratório de Cultura Celular pela ajuda, paciência e apoio: Juliana Ueda, Carolina Caliari, Julia Teixeira de Azevedo, Kalil Alves de Lima, Mariana Davanso, Robson Amaral, Rafael Biaggio, Amanda Mizukami, Mario Soares Neto, Lucas Catelli e Monize Decarli. Em especial à Rosane Bolzoni, Ana Júlia Machry e Maria Isabel da Mata pelo apoio técnico;

À todos os amigos, estudantes e funcionários do Hemocentro, que atuam na prestação de serviços de excelência e pesquisa científica de qualidade;

Aos meus amigos(as) de moradia e de pós-graduação durante essa caminhada, pela diversão, companheirismo e descontração, em especial ao Mario Soares Neto, Maria Cláudia Silva, Germano Reis, Omar Martinez, Matheus Zanela, Rafael Prado, Ronivaldo Rodrigues e Tiago Medina. À toda “turma da pelada”, aos meus amigos "de som" e "de copo";

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma pela realização desse projeto e pela minha formação acadêmica, meu MUITO OBRIGADO!

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte"

Albert Einstein

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.....	47
Figura 2. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	48
Figura 3. Reconstituição de linfócitos T <i>naïve</i> e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	52
Figura 4. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	53
Figura 5. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.	54
Figura 6. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	55
Figura 7. Reconstituição de linfócitos T reguladores CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.....	56
Figura 8. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.....	59
Figura 9. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	60
Figura 10. Reconstituição de linfócitos T <i>naïve</i> e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH	63
Figura 11. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.	64
Figura 12. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.	65
Figura 13. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.....	66
Figura 14. Reconstituição de linfócitos T reguladores CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características clínico-demográficas dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1 no período pré-transplante	32
Tabela 2: Avaliação da resposta clínica dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1 após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) até abril de 2013	33
Tabela 3: Características clínico-demográficas dos pacientes com esclerose múltipla no período pré-transplante	34
Tabela 4: Avaliação neurológica e resposta clínica dos pacientes com esclerose múltipla (EM) após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) até setembro de 2012.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Doenças autoimunes	2
1.2. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	3
1.3. Esclerose múltipla	9
1.4. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em doenças autoimunes.....	14
1.5. Reconstituição imunológica após TACTH.....	20
2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Delineamento do estudo	29
4.2. Pacientes e controles.....	29
4.2.1. Pacientes com diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	29
4.2.2. Pacientes com esclerose múltipla.....	30
4.2.3. Controles	31
4.3. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas	36
4.3.1. Mobilização das células-tronco hematopoéticas	36
4.3.2. Fase de condicionamento.....	36
4.3.3. Infusão das células-tronco hematopoéticas.....	37
4.3.4. Seguimento do pacientes após o transplante	37
4.4. Imunofenotipagem das subpopulações celulares no sangue periférico.....	37
4.5. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS	42
5.1. Resultados clínicos.....	42
5.1.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	42
5.1.2. Esclerose múltipla	43
5.2. Reconstituição imunológica.....	44
5.2.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	44
5.2.2. Esclerose múltipla	57
6. DISCUSSÃO	69
6.1. Resposta clínica dos pacientes com DM1 e EM após a terapia com IAD/TACTH ...	69
6.2. Reconstituição imunológica.....	70
6.2.1. Reconstituição de linfócitos T e B.....	71
6.2.2. Reconstituição de células T <i>naïve</i> , de memória e células T recém-imigradas do timo	74
6.2.3. Reconstituição de células T supressoras.....	80
6.2.4. Reconstituição de linfócitos T reguladores	81
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMO

ARRUDA, L.C.M. **Reconstituição imunológica após transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla.** 2013. 130f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Ensaio clínico demonstrou que a imunossupressão em altas doses (IAD) seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TACTH) é capaz de suprimir a atividade inflamatória em pacientes com doenças autoimunes (DAIs) e induzir remissões clínicas prolongadas nesses pacientes, porém os mecanismos de ação do TACTH ainda não estão bem esclarecidos. O racional dessa terapia baseia-se na eliminação das células autorreativas pela IAD e na reconstituição de um sistema imunológico novo e tolerante após o transplante a partir dos precursores hematopoéticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reconstituição imunológica em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1, N=21) e pacientes com esclerose múltipla (EM, N=37) sequencialmente após o TACTH, e correlacionar os dados imunológicos com a resposta clínica dos pacientes ao transplante. Os pacientes com EM e DM1 foram divididos em dois grupos com base na resposta clínica após o transplante: respondedores (EM-R; N=22) e não-respondedores (EM-NR; N=15); livres de insulina por período maior ou igual a 3 anos (DM1 $\geq$ 3 anos; N=11) e livres de insulina por período menor que 3 anos (DM1<3 anos; n=10); e acompanhados clínica e imunofenotipicamente por seis anos. Em relação ao período pré-transplante, todos os grupos de pacientes com DM1 e EM apresentaram: 1, diminuição do número absoluto de células T CD3⁺ praticamente em todos os períodos pós-transplante avaliados, indicando uma intensa linfopenia decorrente da IAD; 2, aumento acentuado do número de linfócitos T CD8⁺ e a diminuição dos linfócitos T CD4⁺, resultando na inversão da razão CD4:CD8 durante todo o seguimento pós-transplante avaliado; 3, aumento significativo no primeiro ano após o transplante das subpopulações de células T CD8⁺ de memória central CD27⁺CD45RO⁺ e memória efetora CD27⁻CD45RO⁺; 4, normalização dos números de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *naïve* CD27⁺CD45RO⁻ somente cinco anos após o transplante, enquanto o número de células T CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ recém-emigrantes do timo manteve-se abaixo dos valores pré-transplante durante todo o período avaliado, demonstrando que durante os seis anos de seguimento após a IAD/TACTH predominaram mecanismos timo-independentes de reconstituição imunológica; 5, normalização dos números de linfócitos B CD19⁺ entre dois a três meses pós-transplante. O grupo de pacientes com DM1 que obteve melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (DM1 $\geq$ 3anos) apresentou, em comparação ao período pré-transplante, número diminuído de células T CD3⁺ (linfopenia) em vários períodos pós-transplante, número aumentado de células T CD8⁺CD28⁻ supressoras no primeiro ano pós-transplante principalmente, número diminuído de células T CD4⁺ de memória efetora nos períodos 2 a 9 meses pós-transplante e número aumentado de células T reguladoras

CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ pós-transplante. O grupo de pacientes com EM com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (EM-R) apresentou, em comparação ao período pré-transplante, número diminuído de células T CD3⁺ (linfopenia) em vários períodos pós-transplante e números aumentados de células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ e CD8⁺CD28⁻ supressoras nos primeiros três anos pós-transplante. Vale ressaltar que os pacientes com DM1 e EM que apresentaram melhor resposta clínica permaneceram linfopênicos por maiores períodos de tempo após o transplante. Desse modo, esse estudo revelou que a resposta terapêutica dos pacientes com DM1 e EM ao TACTH depende de uma linfopenia persistente, além do aumento de células T reguladoras e supressoras e diminuição de células T CD4⁺ de memória após o transplante.

Palavras-chave: autoimunidade, transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas, *diabetes mellitus* tipo 1, esclerose múltipla, reconstituição imunológica, terapia celular.

ABSTRACT

ARRUDA, L.C.M. **Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetes and multiple sclerosis patients.** 2013. 130p. Master's dissertation. School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Clinical trials have shown that high-dose immunosuppression (HDI) followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is able to suppress the inflammatory activity in patients with autoimmune diseases (AID) and induce prolonged clinical remissions in these patients, but the mechanisms of action of AHSCT are still not well understood. The rationale of this therapy is based on the elimination of autoreactive cells by HDI and on the reconstitution of a new tolerant immune system after transplantation from hematopoietic precursors. The aim of this study was to evaluate the immune reconstitution in patients with type 1 diabetes *mellitus* (T1D, N=21) and patients with multiple sclerosis (MS, N=37) sequentially after the AHSCT, and correlate the immunological data with the clinical response of these patients to the transplant. Patients with MS and T1D were divided into two groups based on clinical response following transplantation: response (MS-R, N=22) and non-response (MS-NR, N=15); insulin-free for a period longer or equal to 3 years (T1D $\geq$ 3 years, n=11) and insulin-free for less than 3 years (T1D<3 years, n=10); and accompanied clinical and immunophenotypically by six years. Regarding the pre-transplant period, all groups of patients with T1D and MS showed: 1, decreased absolute number of CD3⁺ T cells in virtually all post-transplant periods evaluated, indicating an intense lymphopenia resulting from HDI; 2, sharp increase in the number of CD8⁺ T lymphocytes and decreased CD4⁺ T lymphocytes, resulting in inversion of CD4:CD8 ratio throughout the follow-up post-transplant evaluation; 3, a significant increase, in the first year after transplantation, of CD8⁺ T central memory CD27⁺CD45RO⁺ and effector memory CD27⁺CD45O⁺ cell subpopulations; 4, normalization of CD4⁺ and CD8⁺ T *naïve* CD27⁺CD45RO⁻ lymphocytes numbers only five years after transplantation, whereas the number of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T cells newly emigrants from the thymus remained below the values pre-transplant during the study period, showing that during the six years of follow-up after the HDI/AHSCT mechanisms thymus-independent immune reconstitution were predominant; 5, normalization of CD19⁺ B lymphocytes numbers in two to three months post-transplant. The group of patients with DM1 that had the best clinical response after treatment with IAD/AHSCT (T1D $\geq$ 3years) showed, in comparison with the pre-transplant period, decreased number of CD3⁺ T cells (lymphopenia) at various times after transplantation, increased CD8⁺CD28⁻ suppressor T cells numbers in the first year post-transplant, decreased number of CD4⁺ effector memory in periods of 2 and 9 months post-transplant and increased number of CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ regulatory T cells after transplantation. The group of MS patients with better clinical response after treatment with IAD/AHSCT (MS-R) showed, in comparison to the pre-transplant period, decreased number of CD3⁺

T cells (lymphopenia) at various times after transplantation and increased numbers of CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ regulatory Tcell and CD8⁺CD28⁻ suppressor in the first three years post-transplant. It is noteworthy that patients with T1D and MS which showed better clinical response remained lymphopenic for longer periods of time after transplantation. Thus, this study revealed that the therapeutic response of patients with T1D and MS depend on a AH SCT to persistent lymphopenia, and increased regulatory and suppressor T cells and decreased number of CD4⁺ effector memory after transplantation.

Keywords: autoimmunity, autologous hematopoietic stem cell transplantation, type 1 diabetes, multiple sclerosis, immune reconstitution, cell therapy.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças autoimunes

As doenças autoimunes (DAIs) constituem um grupo complexo e heterogêneo de doenças, que acometem 5-8% da população geral, e são caracterizadas pela reatividade imunológica humoral e celular contra tecidos próprios. Se desenvolvem quando linfócitos autorreativos escapam dos mecanismos de tolerância imunológica, são ativados e lesionam tecidos próprios (1-5).

A tolerância imunológica compreende uma rede de mecanismos que visam a não-responsividade a antígenos próprios, envolvendo a eliminação ou inativação dos linfócitos autorreativos durante sua ontogenia nos órgãos linfoides primários, ou o controle da autorreatividade nos órgãos linfoides secundários e tecidos alvo. Os mecanismos de tolerância imunológica podem ser classificados em central e periférica (3, 6-8).

Os mecanismos de tolerância central (processos de seleção positiva e seleção negativa) dependem da interação antígeno-receptor nos órgãos linfoides primários (no timo para os linfócitos T e na medula óssea para os linfócitos B) e são controlados por diversos “*checkpoints*” nos estágios de desenvolvimento do linfócito imaturo. Ocorrem em linfócitos em desenvolvimento que reconhecem antígenos próprios com alta avides, e resultam em: edição de receptor, anergia, apoptose e geração de células reguladoras (9-12). Porém, diversos clones autorreativos que reconhecem antígenos próprios com baixa avides, e que consequentemente não são eliminados pelos mecanismos de tolerância central, podem escapar para a periferia e ser potencialmente perigosos, fazendo com que a homeostasia do sistema imune seja mantida também por mecanismos periféricos de tolerância (3, 11, 13, 14).

A tolerância periférica resulta da inativação da resposta dos linfócitos maduros autorreativos circulantes na periferia e é controlada pelos seguintes mecanismos: inativação funcional ou anergia, deleção por apoptose ou supressão por células T reguladoras (Tregs) (11, 14-16).

O conceito original de que a autorreatividade é patológica foi contestada por inúmeros achados, os quais demonstraram que autoanticorpos e linfócitos autorreativos representam uma população normal do repertório celular do sistema imunológico (17-19). Diversos trabalhos mostraram que o autorreconhecimento desempenha importante papel na sobrevivência e manutenção da viabilidade celular de linfócitos T *naïve*, até esses entrarem em contato com o antígeno para qual são específicos (20-24). O repertório de células T maduras na periferia é regulado por mecanismos homeostáticos complexos, onde as células T *naïve* são mantidas pela interleucina-7 (IL-7) e pela sinalização resultante da interação do receptor de células T

("T Cell Receptor" - TCR) com o complexo principal de histocompatibilidade ("Major Histocompatibility Complex" - MHC) apresentando peptídeos próprios, que juntos fornecem estímulos submitôgenos de sobrevivência (25). Portanto, a exposição contínua a antígenos próprios é fisiológico e crucial para o funcionamento normal do sistema imune, pois o não reconhecimento e consequente falta de estímulo autoantigênico diminui o tempo de vida dos linfócitos T *naïve* maduros (25-28).

Assim, a autorreatividade não é mais vista mais como patológica, mas sim como fisiológica, sendo o desafio entender como isso se torna um processo patológico e como as células imunes, principalmente células T e B, contribuem para a lesão tecidual (1).

Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de DAIs ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que essas doenças resultem de uma interação entre vários fatores desencadeantes, como genéticos e ambientais, bem como defeitos nos processos de imunorregulação, tais como redução do número de células Tregs e função defeituosa destas células (2-4).

O caráter idiopático das DAIs tem impedido o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas à etiologia dessas doenças, tornando as DAIs uma importante causa de morbidade e mortalidade, além de representar um problema econômico-social relevante, pois afetam frequentemente adultos jovens economicamente ativos, principalmente mulheres (3). Os tratamentos convencionais procuram combater o processo inflamatório crônico das DAIs através do uso de medicações anti-inflamatórias ou imunossupressoras, visando a inibição da resposta imunológica patogênica. No entanto, as medicações imunossupressoras atuam indistintamente sobre as diversas células do sistema imune, não constituindo, portanto, uma terapia específica contra as células autorreativas.

1.2. Diabetes *mellitus* tipo 1

O *diabetes mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina. É considerada uma doença crônica grave que se manifesta principalmente em crianças, com 90% dos casos ocorrendo na infância/adolescência (até os 20 anos) e de 5% a 10% na fase adulta (29-32). O DM1 compreende apenas de 5% a 10% de todos os casos de diabetes, mas está associado à uma alta frequência de complicações vasculares e comprometimento da qualidade e expectativa de vida (33, 34). No total, há cerca de 10-20 milhões de pessoas afetadas em todo mundo, contribuindo com isso, para os gastos socioeconômicos referentes à

intervenção médica necessária ao tratamento dessa doença (29), sendo o gasto anual nos Estados Unidos com a doença de 14,4 bilhões de dólares (35).

Recentemente, tem se verificado um aumento na incidência do DM1 mundialmente, cerca de 2-5% por ano, onde os novos casos dobraram nos últimos 20 anos, acometendo crianças cada vez mais novas, principalmente antes dos 5 anos (31, 32, 36-38).

O início dos sinais clínicos (*e.g.*, perda de peso, polidipsia, poliúria e aumento do apetite) manifestam-se após a destruição de aproximadamente 80-90% das células β (39). O processo destrutivo das células β leva à falta de insulina, hormônio essencial no metabolismo de carboidratos, resultando em hiperglicemia crônica pela diminuição da captura de glicose da circulação. Na ausência de insulina há também alteração no metabolismo da gordura e gliconeogênese, ocorrendo aumento da quebra de gordura e da oxidação de ácidos graxos, resultando em excessiva produção de cetonas. Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Assim, os pacientes necessitam de tratamento permanente com insulina exógena para sobrevivência (40).

As principais complicações agudas do DM1 são a cetoacidose diabética e coma hiperglicêmico hiperosmolar. As complicações crônicas graves incluem os problemas microvasculares, que levam à retinopatia (podendo levar à cegueira), nefropatia (com insuficiência renal frequente) e neuropatia; e macrovasculares, como doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (33, 41). A morte abaixo da idade de 20 anos é geralmente devida à cetoacidose diabética, hipoglicemia ou infecções, e acima de 20 anos as principais causas são as doenças renais e vasculares (42-44).

Na década de oitenta, Eisenbarth propôs o modelo atual para o desenvolvimento da autoimunidade no DM1 (45). Apesar do avanço do conhecimento desde essa época, o modelo proposto ainda se faz pertinente. O modelo propõe que todo indivíduo nasce com um grau de susceptibilidade e chance de desenvolver DM1: para alguns indivíduos essa susceptibilidade é alta, enquanto para outros é muito baixa. A susceptibilidade ao DM1 é em grande parte hereditária, residindo predominantemente nos genótipos de HLA ("*Human Leucocytes Antigens*") DR e DQ, e em menor extensão em uma série de outros *loci* genéticos denominados genes de susceptibilidade IDDM ("*insulin-dependent diabetes mellitus*"). O locus do HLA confere cerca de 50% da susceptibilidade genética, com pequena contribuição (15%) de outros genes, como o IDDM2 (*insulin*-VNTR) e IDDM12 (CLTA-4) (46-49). Haplótipos de HLA que conferem alto risco (*e.g.*, DR3/4, DQA1*0301-DQB1*0302, e DQA1*0501-DQB1*0201) ou proteção (*e.g.*, DQA1*0102-DQB1*0602, associado à

resistência à diabetes, e o DRB1*1401, associado à proteção) foram identificados (32, 46). Outros genes, associados tanto a síndromes raras ou outras doenças autoimunes (*e.g.*, AIRE e FOXP3), também têm um papel na patogênese e susceptibilidade ao DM1 (50).

O próximo passo do modelo proposto por Eisenbarth requer exposição a um ou mais agentes ambientais que alteram a função imunológica, iniciando assim a destruição de células β . Dentre os agentes desencadeadores, estão incluídos os vírus (*e.g.*, enterovírus, rubéola congênita, citomegalovírus) (51-53), toxinas (*e.g.*, nitrosaminas) (54), ou alimentação (*e.g.*, cereais, proteínas do leite de vaca e glúten) (55-59).

A ativação anormal do sistema imune em indivíduos susceptíveis, mediada por células dendríticas e células T autorreativas, conduz a uma resposta inflamatória dentro das ilhotas pancreáticas (insulite), bem como a uma resposta humoral pela ativação de células B e produção de autoanticorpos contra antígenos específicos das células β pancreáticas. Os principais autoanticorpos formados são o anti-insulina (IAA), anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD/GAA) e anti-proteína tirosina fosfatase IA-2 (IA-2AA) (48). Ainda não está claro se esses autoanticorpos participam diretamente da destruição das células β ou aparecem secundariamente devido à ativação de células B autorreativas via autoantígenos liberados das ilhotas danificadas por outros componentes do sistema imune. A presença de um ou mais tipos de anticorpos pode preceder o aparecimento clínico do DM1, por anos ou décadas (60-62). A presença e persistência de positividade para vários autoanticorpos aumenta a probabilidade de progressão para doença clínica.

Além da presença de autoanticorpos, a detecção de células T autorreativas contra autoantígenos presentes nas células β pancreáticas, que incluem a insulina, o GAD e a IA-2, no sangue periférico de indivíduos diabéticos recém-diagnosticados, comprovam que mecanismos de autoimunidade estão envolvidos na destruição das células β no DM1 (63-65).

Diversos trabalhos em modelos animais de diabetes autoimune têm descrito o envolvimento de várias células do sistema imune na patogenia do DM1 (66-68). Um dos modelos animais que é extensivamente utilizado no estudo da patogênese do DM1 são os camundongos NOD ("*Non-obese diabetic*"), uma vez que trata-se de um modelo experimental de diabetes autoimune espontâneo insulino-dependente, que compartilha várias características imunológicas e patológicas com a doença humana (69). Nesse modelo experimental foi observado que células T $CD4^+$, $CD8^+$ e macrófagos possuem papel fundamental na destruição e morte das células β . Outros tipos celulares também estão presentes no infiltrado pancreático e linfonodos drenantes, incluindo células B, NK, NKT e subtipos de células dendríticas

(CDs), todas potencialmente relacionados à destruição autoimune das células β (66, 68, 70-74).

O estágio precoce do DM1 é caracterizado por uma insulite, onde é observada a inflamação das ilhotas de Langerhans, com infiltrado de células mononucleares (71). Macrófagos e CDs são as primeiras células a infiltrarem as ilhotas pancreáticas (72), sendo as principais responsáveis pela apresentação dos antígenos das células β aos linfócitos autorreativos, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- β) e óxido nítrico, contribuindo para a destruição das células β (75-77). Além disso, tornou-se evidente que eles são responsáveis pela produção de IL-12 (78), importante na promoção e diferenciação das células T CD8⁺ citotóxicas diabetogênicas no início do DM1 (67). A alta frequência de CDs apresentando antígenos específicos de células β nos linfonodos drenantes em períodos iniciais do diabetes autoimune experimental, sugerem que os antígenos liberados com a morte dessas células sejam capturados por CDs nas ilhotas e apresentados às células T específicas autorreativas nos linfonodos, no qual a resposta diabetogênica é iniciada (68, 73). Conforme há destruição de novas células β , uma maior quantidade de novos antígenos intracelulares são expostos ("*epitope spreading*"), aumentando o repertório de antígenos potencialmente reconhecidos por linfócitos autorreativos e amplificando a reposta autoimune (79). Além disso, outros trabalhos demonstraram que as CDs de camundongos NOD têm uma maior capacidade de ativar as células T pela alta produção de IL-12 e expressão de moléculas co-estimuladoras (80, 81), promovendo maior ativação da resposta imune adaptativa, com papel ímpar das células T CD8⁺.

A imunidade adaptativa no DM1 é primariamente mediada por células T (75). Citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF, IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-21 e IL-17, produzidas principalmente por células T CD4⁺ autorreativas, promovem inflamação com consequente destruição das células β , além de atraírem e ativarem outras células T, células B, macrófagos e CDs (82-85). Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β , conferem proteção ao DM1 (83-85). As células T "*helper*" do padrão 1 (Th1) desempenham papel central na resposta imune e patogênese do DM1. O principal mecanismo de ação das células Th1 na patogênese da DM1 é por intermédio da produção de citocinas, principalmente IFN- γ e IL-12, que potencializam respostas imunes mediadas por células, incluindo a ativação de macrófagos e de células T CD8⁺ citotóxicas. Em modelos experimentais, foi mostrado que o desenvolvimento da doença requer a presença de ambas células T CD4⁺ e CD8⁺ (86). Camundongos NOD atímicos ou com

imunodeficiência severa combinada (NOD/*scid*) não desenvolvem insulite ou diabetes (86, 87). Além disso, células T isoladas de camundongos NOD são capazes de transferir a doença para animais não-diabéticos e acelerar o início do diabetes em camundongos NOD neonatos (88, 89).

São vários os mecanismos sugeridos pelos quais as células T e da imunidade inata interagem com as células β pancreáticas e provocam sua morte. Os principais mecanismos elucidados são: (A) o mecanismo associado ao reconhecimento, (B) e o mecanismo associado à ativação (75, 90). No mecanismo (A) as células T $CD8^+$ destroem as células β de maneira direta, através da ativação mediada pelo MHC de classe I (MHC-I) expressando antígenos próprios das células β . A ativação das células T $CD8^+$ provoca a morte das células β por contato, através das vias de sinalização por Fas/FasL (91), ou pela liberação de perforina/granzima (92). No mecanismo (B) ambas células T $CD4^+$ e $CD8^+$ reconhecem antígenos das células β apresentados por células apresentadoras de antígenos ("*antigen-presenting cells*", APCs) (macrófagos e CDs) pelo MHC-II e MHC-I respectivamente. As células T ativadas produzem citocinas, tais como $INF-\gamma$, que induz a expressão do receptor Fas pelas células β . A ligação do Fas ao FasL, expresso em células T ativadas, desencadeia mecanismos de apoptose na célula β (93). Além da ação deletéria nas células β , o $INF-\gamma$ ativa os macrófagos a produzir uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias como $IL-1\beta$ e TNF que, juntamente com o próprio $INF-\gamma$, induz a produção de óxido nítrico, importante na indução de apoptose. As células β expressam elevados níveis do receptor de $IL-1$ ($IL-1R$) e são, dentre todas as células endócrinas da ilhota, as mais sensíveis a indução da apoptose mediada pela $IL-1\beta$ (93).

Nos últimos anos, as células Th17 (94) têm sido amplamente associadas às doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (95). As células Th17 produzem grandes quantidades de $IL-17$, potente citocina inflamatória que está elevada em modelos de autoimunidade e em humanos com DAIs, como na artrite reumatóide e esclerose múltipla (96-99). Em camundongos NOD, a inibição das células Th17 preveniu o desenvolvimento do DM1 e diminuiu a inflamação nas ilhotas pancreáticas (100, 101). Por outro lado, em humanos, o papel das células Th17 ainda não é esclarecido. Bradshaw e colaboradores demonstraram um aumento significativo na frequência de células T secretoras de $IL-17$ em pacientes com DM1 crônicos, mas não em pacientes recém-diagnosticados, quando comparado aos controles saudáveis (102). Em crianças com DM1 recém diagnosticadas há uma maior frequência de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ produtoras de $IL-17$ (103). Além disso, as células T isoladas de

crianças diabéticas possuem maior secreção de IL-17 e expressão de IL-17A e RORC2, contribuindo para uma maior resposta inflamatória e taxa de apoptose em ilhotas humanas (104). Nesse contexto, Arif e colaboradores (105) mostraram que células T desses pacientes apresentaram maior produção de IL-17 em resposta à antígenos das células β . O mesmo não foi observado em pacientes com DM1 crônico, o que sugere que as células Th17 estão envolvidas nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença. Vale ressaltar que a IL-17 isoladamente não teve qualquer efeito apoptótico em cultivo com ilhotas humanas, mas em combinação com IL-1 β , IFN- γ e TNF- α observou-se apoptose exacerbada das ilhotas (105). Esses resultados sugerem uma possível ação sinérgica das células Th1 e Th17 na patogênese da DM1 humana.

As Tregs (106), ao contrário do potencial patogênico das outras células T (Th1 e Th17), parecem proteger contra o desenvolvimento do diabetes. Camundongos NOD deficientes em Tregs, desenvolvem a doença de forma mais acelerada (107). Além disso, animais NOD diabéticos possuem menor frequência de Tregs do que animais Balb/c não-diabéticos (108). Pacientes portadores da síndrome IPEX ("*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*"), que apresentam uma mutação no gene FOXP3, fator de transcrição responsável pela diferenciação das Tregs, podem também desenvolver DM1 (109). Um desequilíbrio da razão Treg/Th17 foi observada em pacientes com DM1 e pode estar relacionada também com a patogênese da doença (110). Essa razão é cinco vezes menor nos linfonodos pancreáticos (PLNs) de pacientes com DM1, sendo que o grupo diabético exibiu maior frequência de células produtoras de IL-17 nos PLNs quando comparado a indivíduos saudáveis. Além de uma menor frequência de Tregs nos PLNs, a capacidade supressora dessas células apresentou-se diminuída nos pacientes com DM1 (111-113).

Estudos indicam que as células B atuam como APCs para ativação de células T específicas contra antígenos das células β pancreáticas (114). A depleção de células B em camundongos NOD resultou em uma diminuição do processo de insulite e preveniu o desenvolvimento do diabetes em cerca de 60% dos animais depletados (115). Entretanto, quando a depleção de células B é feita após o início da doença (camundongos NOD com 15 semanas de idade) há um atraso na progressão da doença, mas não a inibição do seu desenvolvimento (115).

O melhor tratamento estabelecido para o DM1 é o rígido controle da glicemia obtido por injeções frequentes e diárias de insulina, ou por infusão subcutânea contínua de insulina, chamado de terapia insulínica intensiva (TII). Este tratamento reduz o risco de retinopatia,

nefropatia e neuropatia entre 35% a 90% quando comparado com a terapia convencional com 1 ou 2 injeções por dia (116). Ensaios clínicos com corticoides (117), azatioprina (118, 119), azatioprina/corticoides (120), ciclosporina (121), anticorpo monoclonal anti-CD3 (122, 123), proteína do choque térmico “*heat shock protein*” (124), globulina anti-timócito (125) e vacina de DNA (126), que visam a preservação funcional da massa de células β residual, vêm sendo realizado com resultados significativos, mas insuficientes para a aplicação clínica rotineira, pois a maioria dos pacientes requer fonte exógena de insulina após o término da terapia.

Sabendo que a DM1 é uma doença complexa, influenciada por fatores genéticos e ambientais, onde ambas, imunidade inata e adaptativa, possuem importância na patogênese, novas alternativas terapêuticas devem ser propostas tendo em vista essa complexidade.

1.3. Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma DAI crônica e inflamatória do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela destruição da bainha de mielina dos neurônios por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ autorreativos, autoanticorpos e micróglia ativada (127-129).

A EM é altamente prevalente em caucasianos e estima-se que mais de um milhão de pessoas em todo o mundo são afetadas pela doença (130). A sua prevalência é entre 1/500 e 1/1500 na população da Europa, América do Norte e Austrália, afetando principalmente adultos jovens, com idade entre 15 e 45 anos, sendo as mulheres duas vezes mais afetadas em relação aos homens (128, 131). Portanto, tem grande impacto socioeconômico, pelo fato de poder levar adultos jovens à incapacidade precoce. O curso clínico é variável, embora a maioria dos pacientes desenvolvam deficiência locomotora significativa de 15 a 30 anos após o início da doença (132).

A localização das lesões, as manifestações clínicas e a intensidade dos sintomas variam de um paciente para outro. As lesões inflamatórias observadas nos pacientes estão associadas à formação de placas escleróticas e à presença de placas de desmielinização no SNC, localizadas preferencialmente em torno dos ventrículos, medula espinhal, corpo caloso, nos nervos ópticos e no tronco cerebral, acarretando em várias disfunções neurológicas tais como incapacidades por deficiências de função motora, neurocognitiva e autonômica (128, 133, 134).

Os sintomas da doença são inespecíficos e muito variáveis, tais como parestesias, paresias, ataxia, tremor, neurite óptica, fadiga e alterações esfinterianas. Essas manifestações clínicas indicam o envolvimento do sistema motor, sensorial, visual e autonômico. Apesar de sua complexidade e heterogeneidade clínica pode ser classificada em quatro formas clínicas

principais: forma remitente-recorrente (EM-RR), forma surto-remissiva (EM-SR), primária-progressiva (EM-PP) e secundária-progressiva (EM-SP) (135, 136).

A forma EM-RR caracteriza-se por surtos episódicos subagudos, seguidos de recuperação espontânea total da disfunção clínico-neurológica, intercalados por períodos de remissão, com novos surtos esporádicos que não passam de 1 a 5 por ano (134). Corresponde a cerca de 80% dos casos iniciais. Porém, com o tempo, a recuperação de cada surto se torna cada vez mais incompleta e os sintomas se tornam persistentes e acumulativos.

Os surtos são causados pela quebra da barreira hematoencefálica e entrada de linfócitos T autorreativos ativados no SNC, causando inflamação aguda (129, 134, 137). O aumento na frequência desses surtos e recuperação inadequada nos primeiros anos da doença clínica prediz uma progressão mais rápida. A presença de múltiplas lesões gadolínio-positivas nas imagens por ressonância magnética nuclear (RMN) indica a ruptura da barreira hematoencefálica, inflamação e curso mais grave da doença (129, 134, 137, 138). Eventualmente, cerca de 65% dos pacientes com EM-SR entram na fase EM-SP, e em 10-20% dos casos, a doença é progressiva desde o início. Em ambas as situações, a progressão se inicia em torno dos 40 anos (139).

A EM-PS corresponde a uma fase neurodegenerativa, associada a uma diminuição significativa da frequência de lesões e do volume do parênquima cerebral (atrofia cerebral) (134, 137, 138). Além da forma EM-SR, há a forma clínica EM-PP, menos comum e observada em 10-15% dos pacientes. A forma EM-PP apresenta um curso clínico rapidamente progressivo levando a uma incapacidade neurológica grave ou, até mesmo, à morte em um curto período de tempo (128, 129, 132).

Os critérios diagnósticos para a doença foram inicialmente descritos por Poser (140) e McDonald (141) e eram baseados na história clínica do paciente e em exames físicos. Atualmente, a EM é diagnosticada baseando-se em dados clínicos, radiológicos e laboratoriais (136). Os dados clínicos por si só podem ser suficientes para o diagnóstico de EM: indivíduos que tenham sofrido dois ou mais episódios de sintomas neurológicos e cognitivos característicos da EM (*e.g.*, nistagmo, tremor intencional e fala telegráfica) e não justificados por outras patologias (136, 140, 141). Porém, o uso rotineiro de outras técnicas confirmatórias (laboratoriais e radiológicas) são importantes para o acompanhamento do paciente. A RMN é útil como método diagnóstico auxiliar e para estudo da sequência de eventos que resultam na formação da lesão, possibilitando melhor compreensão da sua patogenia e monitoramento do tratamento.

As avaliações neurológicas por RMN inclui a avaliação do EDSS ("*Expanded Disability Status Score*") (142) e lesões gadolíneo positivas. O EDSS constitui uma escala de medida das condições neurológicas e motoras do paciente. É baseada em avaliações radiológicas das oito áreas do sistema nervoso central conhecidas como sistemas funcionais e no grau de disfunção nestes sistemas, como a dormência transitória na face ou dedos, ou os distúrbios visuais. Além disso há avaliação da incapacidade funcional no que se refere à mobilidade, usando sobretudo a deambulação e distância percorrida a pé como principais parâmetros. O EDSS varia de zero (exame neurológico normal) a dez (óbito devido à EM) (**Anexo A**). O aumento de 1,0 ou mais pontos na escala EDSS em dois exames repetidos, num intervalo mínimo de três meses, caracteriza progressão neurológica na EM. As lesões gadolíneo positivas visam salientar as placas inflamatórias ativas e demonstrar a presença de lesões anteriores, mesmo que não estejam associadas com os sintomas no momento do exame.

Os exames laboratoriais incluem principalmente punção lombar para análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), onde se observa a presença de bandas oligoclonais de Imunoglobulina G (IgG) (143) em 75% a 85% dos pacientes com EM, que indicam produção intratecal de Igs e são marcadores de inflamação. A produção intratecal de IgG apresenta-se elevada em 70 e 90% dos casos. A presença de linfocitose e hiperproteínoorraquia no LCR são indicativos de inflamação no SNC e preditivos de EM (143).

A etiologia da EM não está completamente elucidada, mas sabe-se que envolve a interação de fatores genéticos e ambientais para o seu desencadeamento (144, 145).

As associações genéticas mais relevantes na EM são os alelos HLA de classe II, em particular os grupos de alelos HLA-DR15 e DQ6, principalmente do genótipo DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, e DQB2*0602 (146). Os alelos DR4 e DQ1 estão associadas à suscetibilidade em diversas populações mundiais (133, 147, 148) e o alelo DRB1*1501 na população brasileira (149). Novos *loci* capazes de conferir efeito protetor foram adicionados à lista: HLA-C5 (150) e HLA-DRB1*11 (151, 152); e marcadores de polimorfismo associados aos receptores da interleucina 2 e 7 associados à suscetibilidade (153-155). Parentes de primeiro grau de indivíduos com EM têm risco maior (20-50 vezes) de desenvolver a doença e a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos varia de 20-35% em diferentes estudos, sendo superior à de gêmeos dizigóticos (5%) (144, 145).

A baixa taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos indica a contribuição de fatores não-genéticos na etiologia da EM. A desigualdade de distribuição da doença em gradiente hemisférico e os estudos de migração sugerem a importância do fator ambiental na sua gênese (156, 157). Dentre os fatores ambientais envolvidos no desencadeamento da EM

estão as infecções por herpesvírus 6, *Chlamydia pneumoniae* e principalmente pelo vírus Epstein-Barr, que mostrou ter influência no desenvolvimento da doença, uma vez que estudos demonstraram que 99% dos pacientes com EM são soropositivos para esse vírus (158-162). Foram propostos dois mecanismos para explicar como infecções virais ou bacterianas poderiam induzir a EM (bem como outras DAIs): (A) mimetismo molecular, ativação de células autorreativas por reatividade cruzada entre antígenos não-próprios (agente infeccioso) e próprios; e (B) "*bystander activation*", células autorreativas são ativadas em decorrência de eventos inflamatórios não-específicos que ocorrem durante as infecções (163). Uma terceira proposta seria que as infecções induziriam a EM através da combinação desses dois mecanismos descritos (145). Além disso, diversos autores propuseram outros fatores ambientais associados, como deficiência de vitamina D, dieta, fumo e toxinas (164-166).

Na década de 30, Rivers e colaboradores injetaram suspensões de medula espinhal ou cérebro de coelho em macacos *rhesus* saudáveis e induziram uma doença similar à EM, levando à hipótese de que a EM tratava-se de uma doença autoimune (167). Trabalhos posteriores mostraram que a injeção de componentes proteicos da bainha de mielina, juntamente com adjuvante, em camundongos *naïve*, causava encefalomielite, atualmente conhecida como encefalomielite autoimune experimental (EAE) (168, 169). A EAE também é induzida em camundongos pela transferência adotiva de células T reativas contra mielina, mas não pela transferência de autoanticorpos. Esse fato levou os pesquisadores a concluir que a EM constitui uma doença mediada principalmente por células T (168, 170). A MBP ("*myelin basic protein*"), a PLP ("*proteolipid protein*") e a MOG ("*myelin oligodendrocyte glycoprotein*") constituem os antígenos-alvo das células T autorreativas e de autoanticorpos no SNC de pacientes com EM (159, 171). O fato de que a EM responde a tratamentos imunomoduladores ou imunossupressores também corrobora a natureza autoimune da doença.

Trabalhos da literatura postulam um modelo composto de duas fases para o desenvolvimento da EM. Na primeira fase, um dano no SNC resulta em morte celular e liberação de vários autoantígenos neuronais que atravessam a barreira hematoencefálica, são capturados por APCs e apresentados às células T e B *naïve* autorreativas em um contexto inflamatório nos tecidos linfóides secundários. Em pessoas geneticamente susceptíveis, esses clones são ativados e sofrem expansão clonal. Na segunda fase, as células ativadas migram para o SNC, se acumulam nos locais onde encontram os autoantígenos e liberam mediadores inflamatórios, causando lesão tecidual e desmielinização do SNC (128, 144).

As células T $CD4^+$ e $CD8^+$, apesar de contribuírem de formas diferentes na autoimunidade da EM, atuam de forma conjunta no processo de desmielinização do SNC. As

células T CD4⁺ autorreativas do perfil Th1 apresentam papel central na patogênese da EM. Elas constituem o infiltrado de células inflamatórias encontradas no SNC e no líquor, promovem a produção de autoanticorpos e ativam células T CD8⁺ autorreativas (133, 144, 145, 170, 172). No contexto de funções efetoras, as células T CD8⁺ estão mais envolvidas com os danos no SNC do que as células T CD4⁺, devido à baixa expressão de MHC de classe II no SNC, e evidenciado pelas expansões oligoclonais proeminentes de células T CD8⁺ encontradas no líquor e no SNC de pacientes com EM (173). Além disso a expressão de MHC de classe I é induzida em neurônios danificados. (144, 145, 170, 174, 175).

Vários trabalhos têm demonstrado que as células Treg CD4⁺CD25^{hi} de pacientes com EM, apesar de estarem em frequências normais, são funcionalmente defeituosas ou possuem alterações nos processos de maturação e emigração do timo (50, 176-179).

Os níveis de imunoglobulinas encontram-se elevados no LCR de pacientes com EM, mas não no soro, indicando produção local de autoanticorpos por células B (170). Além disso, as imunoglobulinas apresentam uma distribuição oligoclonal (ou seja, produzidas por células B em expansão clonal) (180) e autoanticorpos anti-mielina podem ser encontrados em áreas de desmielinização ativa no SNC do paciente com EM (181), sugerindo um importante papel dos autoanticorpos na patogênese da EM. Os autoanticorpos podem causar desmielinização pela opsonização e fagocitose da mielina ou via ativação do sistema complemento (144, 145). As células B atuam também como APCs para células T autorreativas.

Embora as células Th1 sejam descritas como mediadoras inflamatórias na EM, as células pró-inflamatórias Th17 também estão criticamente envolvidas na patogênese da doença (182). As células Th17 patogênicas entram precocemente no SNC e atuam como principais desencadeadoras da inflamação na EM (183). Estudos em modelos experimentais mostraram que células Th17 participam da patogênese da EAE (184), onde a IL-17 atua alterando a coesão celular da barreira hematoencefálica, permitindo a entrada de células Th17 e células autorreativas no SNC em modelos animais e em humanos (99, 185). Em humanos, foi mostrado que 40% dos pacientes com EM apresentam números elevados de células mononucleares positivas para mRNA de IL17A no sangue periférico e no líquor, comparando-se com controles (99, 186, 187).

Até o ano de 1993 não existiam terapias licenciadas para o tratamento da EM. A introdução de imunomoduladores na terapêutica da EM ocorreu a partir desse ano e modificou o cenário da doença. Atualmente, o tratamento da EM inclui primeiramente (A) imunomoduladores (*e.g.*, IFN-β1a, acetato de glatiramer), que inibem a ativação de células T, alteram o perfil de ativação de Th1 para Th2 (aumentando a expressão de citocinas anti-

inflamatórias como IL-4, TGF- β e IL-10) e diminuem a migração de células T através da barreira hematoencefálica (188-190); (B) terapia com corticosteróides para tratar os surtos; em casos de doença progressiva e/ou grave, (C) imunossupressores (*e.g.*, ciclosporina, ciclofosfamida, azatioprina) (163, 190). Estudos clínicos com Fingolimod (191), Laquinimod (192) e Fumarato (193), mostraram que o uso oral dessas medicações reduzem a quantidade de surtos e danos no SNC (visualizados por RMN) quando comparados com o grupo placebo, porém estudos complementares de fase III e avaliação dos efeitos adversos se fazem necessários. O uso de rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20) reduziu pela metade a quantidade de surtos quando comparado ao grupo controle (194). A terapia com Alemtuzumab ou campath-1H (anticorpo monoclonal anti-CD52) têm resultados promissores no tratamento da EM-SP, melhorando os exames radiológicos e clínicos (195), sendo largamente utilizados para tratar essa forma da doença (196). Um estudo duplo-cego de fase II mostrou que o Alemtuzumab reduz a taxa de surtos em 74% quando comparado ao IFN β -1a (197). O uso de Daclizumab (anticorpo monoclonal anti-CD25) (198) e de Natalizumab (anticorpo monoclonal anti- α 4 integrina) (199) levou à uma menor quantidade de surtos e de lesões no cérebro.

No entanto, alguns pacientes com EM não respondem a essas terapias imunomoduladoras e uma estratégia terapêutica que vem sendo utilizada em vários centros de referência é a terapia de imunossupressão seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (IAD/TACTH) (200-205).

1.4. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em doenças autoimunes

Apesar de os tratamentos convencionais com drogas imunossupressoras e/ou quimioterápicos promoverem o controle das DAIs em vários pacientes afetados, eles raramente são capazes de curá-las, pois não se reestabelece o estado de autotolerância imunológica nos pacientes. Sendo assim, a terapêutica tem que ser mantida por longos períodos, acarretando em significativa morbimortalidade devido à imunossupressão crônica. Além disso, as recidivas da doença de base são comuns, mesmo na vigência de doses altas de imunossupressores. Diante desse cenário, existe a necessidade de novas estratégias terapêuticas para essas doenças, principalmente para os casos onde a terapêutica convencional não é mais eficaz no controle da progressão da doença, visando controle da autorreatividade e estabelecimento de autotolerância (206-208). Nesse contexto, o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) tem sido usado nos últimos anos como uma alternativa terapêutica para pacientes com DAIs graves e refratárias aos tratamentos convencionais (209).

A iniciativa de se empregar imunossupressão em altas doses (IAD) seguida de transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) no tratamento das DAIs partiu de dois conjuntos de evidências. O primeiro conjunto de evidências originou-se da observação de casos isolados de pacientes que apresentavam, concomitantemente, DAI e doença hematológica e que, após serem submetidos ao transplante de medula óssea alogênico (que envolve IAD com medicação citotóxica e infusão de células-tronco hematopoéticas alogênicas de doadores compatíveis) para tratamento do distúrbio hematológico, obtiveram remissões prolongadas da doença autoimune, sem recaídas da mesma (210). O segundo conjunto de evidências originou-se de estudos utilizando modelos animais de DAIs, que distribuem-se em duas categorias: (A) uma geneticamente determinada, como na linhagem de camundongos NZB/W, que desenvolvem lúpus eritematoso sistêmico (LES) espontaneamente, e outra (B) induzida pela injeção de antígenos em linhagens específicas de camundongos, como da proteína mielínica básica (MBP), causando a EAE. Em ambas categorias, as DAIs podem ser prevenidas ou curadas pela infusão de CTHs após imunoablação, mas, na primeira, as células alogênicas são mais eficientes, enquanto na segunda, que parecem ser modelos mais próximos da doença humana por dependerem conjuntamente da predisposição genética e da exposição a fatores externos para o desencadeamento da doença, tanto os transplantes alogênicos como os autólogos são eficientes (211-213). Assim, essas observações em modelos animais submetidos ao TCTH autólogos ou alogênicos sugeriram que ambas abordagens seriam benéficas para a terapia de pacientes com DAIs refratárias.

No trabalho de van Bekkum e colaboradores, os autores sugeriram que o sucesso do transplante autólogo de células-tronco depende da completa erradicação dos componentes efetores da doença autoimune, principalmente das células T autorreativas de memória (214). Quando translacionados para a clínica, os dados experimentais indicaram que os pacientes deveriam ser submetidos a um regime de condicionamento com altas doses de imunossupressores que promovesse o máximo de linfoablação, e que o enxerto fosse depletado de células T. Quanto maior foi a intensidade da terapia de condicionamento usada, maior foi o sucesso do TACTH na EAE (214, 215).

O TCTH autólogo tem sido usado preferencialmente ao TCTH alogênico no tratamento de DAIs devido ao grande potencial de rejeição observados em transplantes alogênicos e elevada toxicidade, devido ao uso de uma quimioterapia superior à do autólogo. Além disso, o risco da ocorrência de GVHD (*“Graft-Versus-Host-Disease”*) em TCTH

alogênicos, que é devido ao ataque de células T alogênicas do doador contra alo-antígenos do receptor, é relacionado à altas taxas de mortalidade e morbidade (216).

O TCTH autólogo envolve a administração de CTHs autólogas, mobilizadas (utilizando ciclofosfamida e G-CSF, principalmente) previamente da medula óssea do paciente para o sangue periférico. Essas células possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em todos os tipos celulares maduros do sistema hematopoético e imunológico. O paciente é preparado para o transplante por um tratamento prévio com imunossupressor em altas doses (ciclofosfamida e globulina anti-timócito, principalmente), seguido pela infusão de CTHs autólogas para a reconstituição dos sistemas hematopoiético e imunológico, evitando citopenias prolongadas pós-transplante (204, 217, 218).

O primeiro transplante de células-tronco hematopoéticas (CTHs) para tratamento de doenças autoimunes aconteceu em 1996, pelo grupo de Alan Tyndall (219), no qual foram utilizadas CTHs autólogas de pacientes com esclerose sistêmica (ES), sendo os resultados obtidos satisfatórios. A partir de então, vários outros trabalhos descreveram uso de CTHs em outros distúrbios autoimunes, como EM (205, 220), LES (221, 222), ES (223-226), DM1 (202, 203, 218, 227) e outros (206, 209, 228). Esses estudos mostraram que a IAD/TACTH é uma alternativa terapêutica efetiva e segura para o tratamento de DAIs refratárias aos tratamentos convencionais, induzindo remissão clínica prolongada com baixa mortalidade relacionada ao tratamento (206, 207, 227, 229, 230).

Embora os resultados do TACTH variem de doença para doença, mais de um terço dos pacientes apresentam remissões clínicas completas e prolongadas, frequentemente sem necessidade de manutenção de drogas imunossupressoras. Em algumas doenças, entretanto, as recaídas são relativamente frequentes, porém dentre dos pacientes que recaem, vários passam a responder aos tratamentos convencionais que não eram efetivos antes do transplante (204, 206, 225, 229, 231-235).

No ano de 2010, o registro europeu de transplante de medula óssea (*EBMT registry*) publicou a avaliação retrospectiva de 900 pacientes com diversas DAIs que foram submetidos ao tratamento com IAD seguida pelo TACTH entre 1996 e 2007. O estudo mostrou que a IAD/TACTH induz remissão clínica por mais de 5 anos, com sobrevida global de 85% dos pacientes e sobrevida livre de progressão da doença em 43% dos pacientes, sendo portanto alternativa terapêutica eficaz e segura para pacientes com DAIs (206).

Atualmente existem vários estudos clínicos de IAD/TACTH fase III, duplo-cegos, randomizados e controlados (pacientes do grupo controle são tratados com a terapêutica convencional), para tratamento de DAIs (ES, LES e EM) em andamento (206, 235, 236).

Esses estudos comparam a eficácia terapêutica da IAD/TACTH e tratamentos convencionais para DAIs progressivas, graves e refratárias, visando mostrar que a IAD/TACTH é a melhor opção terapêutica nesses casos.

O uso de IAD/TACTH como tratamento para EM começou em meados da década de 1990 e envolveu inicialmente 15 pacientes. Após um tempo médio de seguimento de 6 meses, 12 pacientes apresentaram melhora do quadro clínico (237). Após esse estudo pioneiro, vários outros mostraram a eficácia do IAD/TACTH como terapia alternativa para o tratamento da EM progressiva e refratária à pulsoterapia com ciclofosfamida, sendo que até hoje mais de 600 casos de EM foram tratados (236). Os estudos multicêntricos mostram que três anos pós-IAD/TACTH a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão dos pacientes com EM é de aproximadamente 93% e 55%, respectivamente (206, 238-243). Krasulová e colaboradores demonstraram segurança e eficácia da terapia de IAD/TACTH para EM, acompanhando 26 pacientes por seis anos pós-transplante. Nos períodos de 3 e 6 anos após transplante, a sobrevida livre de progressão foi, de 70,8% e 29,2%, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos pelos pacientes com duração da doença inferior a 5 anos e com idade menor de 35 anos. Os autores concluíram que o IAD/TACTH representa um tratamento alternativo, seguro, efetivo e viável para o tratamento da EM progressiva (244). Em 2011, um estudo monocêntrico grego de fase I/II envolvendo 35 pacientes com EM progressiva grave que foram submetidos ao TACTH, mostrou o resultado de 11 anos de acompanhamento pós-transplante desses pacientes (245). A sobrevida livre de progressão foi de 44% para os pacientes com doença ativa (observada por RMN) e 10% para aqueles com doença inativa. Dezesesseis pacientes obtiveram de 0,5 a 5 pontos (média de 1 ponto) de melhora do escore clínico EDSS durante o período avaliado, e em 9 pacientes não houve mudança do valor de EDSS. Houveram dois óbitos relacionados ao tratamento. As lesões gadolíneo-positivas diminuíram drasticamente após a terapia. Os autores concluíram que: (A) o IAD/TACTH é uma terapia que deve ser reservada aos casos mais graves da doença; (B) deve ser utilizada ainda na fase inflamatória da doença; (C) e que a terapia se mostrou muito eficaz na redução da quantidade e volume das lesões no SNC, promovendo controle da progressão da doença (245).

Com relação ao TCTH para tratamento do DM1, os primeiros transplantes foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa, liderado pelo Dr. Júlio César Voltarelli (*in memoriam*), no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. O objetivo do TACTH no DM1 é preservar a população remanescente de células β pancreáticas produtoras de insulina logo após o diagnóstico da doença. Foram transplantados vinte e cinco pacientes portadores de

DM1, com diagnóstico clínico/laboratorial estabelecido a menos de seis semanas, vinte e um pacientes (84%) ficaram independentes do uso de insulina rapidamente após o transplante e mantiveram esta independência durante períodos variáveis após o transplante (entre 4 a 78 meses). Do total, somente três pacientes (12%) mantiveram-se continuamente livres de insulina exógena após o transplante, sendo que os dezoito restantes (72%) voltaram a usar insulina em doses menores do que as iniciais (202, 203). Esses resultados demonstraram pela primeira vez que a imunossupressão evita a continuidade de sua destruição autoimune, preservando parte das células beta pancreáticas.

Outros centros internacionais reproduziram nosso protocolo de IAD/TACTH para DM-1. Gu e colaboradores demonstraram que dentre os 28 pacientes transplantados, 15 pacientes (53,6%) permaneceram livres de insulina durante um período médio de 19 meses, principalmente aqueles que não tiveram cetoacidose diabética prévia (246). Um outro estudo observou que 6 em 9 pacientes transplantados ficaram livres de insulina (67%) durante o período de 1 ano após o tratamento (247). Li e colaboradores avaliaram 13 pacientes transplantados por um tempo médio de 42 meses, sendo observada independência insulínica em apenas 3 pacientes (23,1%) devido à ocorrência de cetoacidose diabética prévia em 10 pacientes, diminuindo assim a eficácia da terapia (248). Por fim, um estudo polonês demonstrou que 7 em 8 pacientes (87,5%) ficaram livres de insulina por um período médio de 7 meses (249). Nesses trabalhos, os autores concluíram que o IAD/TACTH é uma terapia eficaz na preservação da função das células β residuais nos pacientes com DM1, devendo ser utilizada em pacientes recém-diagnosticados sem episódios de cetoacidose diabética prévia.

Nos últimos anos, ensaios clínicos têm demonstrado que a IAD/TACTH é capaz de suprimir a atividade inflamatória em pacientes com DAIs e pode induzir remissões clínicas prolongadas, porém o mecanismo de ação do transplante ainda não está completamente esclarecido. Algumas hipóteses foram formuladas para tentar explicar o mecanismo de ação do TACTH em DAIs: 1) a imunoablação intensa eliminaria a resposta imunológica patogênica; 2) o TACTH reconstituiria um novo sistema imunológico autotolerante; 3) as células-tronco hematopoéticas promoveriam reparo tecidual (217, 231, 250, 251). No entanto, o mecanismo de ação do TACTH mais aceito é constituído pela cojunção das primeiras duas hipóteses acima citadas, ou seja, a imunossupressão intensa eliminaria o repertório de células autorreativas B e T pré-existentes e o TACTH permitiria a reconstituição de um sistema novo imune tolerante a partir dos precursores hematopoéticos (201, 204, 207, 217, 223, 229, 231, 235, 250-256).

Vale ressaltar que a imunossupressão intensa, promovida pela IAD, é pré-requisito fundamental para o mecanismo de ação do TACTH. Ela é essencial para eliminar os linfócitos autorreativos patogênicos e consequentemente interromper a agressão autoimune enquanto ocorre o “restabelecimento” de um novo sistema imune possivelmente auto-tolerante. Esses trabalhos proveem a base racional para os ensaios clínicos, futuros ou em andamento, dessa estratégia terapêutica em DAIs (252-256). O efeito imunossupressor intenso é o mecanismo chave do TACTH nas DAIs, pelo menos a curto-prazo, nos primeiros meses pós-transplante. Em modelos animais, melhores respostas clínicas foram observadas quando o TACTH foi realizado em fases mais precoces da DAI (com presença de inflamação, fase que responde mais aos tratamentos com imunossupressores) do que em fases mais tardias da doença (217, 231, 251).

Por outro lado, dados da literatura indicam que as células B e T de memória (incluindo as autorreativas patogênicas) não são completamente removidas do sistema hematopoiético e linfóide, bem como de órgãos alvos, por qualquer que seja o regime de condicionamento. Dessa forma, a imunoablação incompleta pode ser responsável pelas recaídas precoces observadas em alguns ensaios clínicos de TACTH (233). No entanto, há evidências de melhora e remissão da DAI após o TACTH apesar da imunoablação incompleta (251). Isso implica que os pacientes que entram em remissão clínica devem possuir mecanismos imunorreguladores que inibem a proliferação de células autorreativas ou as tornem anérgicas após o transplante. Esses mecanismos podem constituir efeitos não-específicos da terapia imunossupressora, tal como a linfopenia pós-transplante com consequente destruição das células T e B autorreativas; ou específicos, como a indução de células T reguladoras ou reativação tímica com formação de um novo repertório dos receptores de células T (201, 251, 257).

Muraro e colaboradores mostraram pela primeira vez que a remissão clínica observada em pacientes com EM após o TACTH, que é acompanhada pela supressão da atividade inflamatória, não é decorrente somente da imunossupressão que esses pacientes recebem, mas de mudanças qualitativas profundas no sistema imunológico, que demonstram uma renovação do compartimento de células T nesses pacientes. Dois anos após o TACTH, os pacientes apresentaram uma diversidade clonal mais ampla do TCR e uma extensa renovação das especificidades clonais comparadas com o pré-transplante, que é devida à produção de novas células T *naïve* pelo timo desses pacientes (201).

No entanto, concomitante ao reaparecimento de novas células T *naïve*, dois trabalhos mostraram a reconstituição tímica de células T autorreativas após o TACTH. Pacientes com

EM submetidos ao IAD/TACTH exibiram supressão significativa de células mononucleares à peptídeos imunodominantes da MBP pelo menos até 20 meses pós-TACTH. Porém, após esse período houve mudança no padrão de reconhecimento antigênico e reatividade contra peptídeos da MBP, mostrando a importância do acompanhamento autolinfoproliferativo pós-TACTH (258). Outro estudo demonstrou o reaparecimento de células T autorreativas anti-mielina por volta de 12 meses após o TACTH também em pacientes com EM, concomitante à reconstituição de novas células T *naïve* produzidas pelo timo (259). Vale ressaltar que os pacientes com EM desses estudos continuaram em remissão clínica da doença mesmo com o reaparecimento de células T autorreativas anti-mielina, demonstrando que a remissão da doença após o transplante não deve-se somente à eliminação das células autorreativas patogênicas mas também a outras mudanças imunológicas induzidas pelo TACTH ainda pouco elucidadas.

Recentemente, Darlington e colaboradores mostraram que a IAD/TACTH promove remissão clínica, com ausência de novas lesões no SNC nos pacientes com EM transplantados, pela diminuição da resposta celular de perfil Th17, sem alterar a resposta de perfil Th1 ou Th2 (260). Os autores observaram também que, concomitantemente à reativação tímica e reaparecimento de novas células *naïve*, ocorreu o ressurgimento de células T CD4⁺ autorreativas, sugerindo que mecanismos imunorreguladores pós-TACTH ainda não elucidados promovem autotolerância (260).

Em resumo, os resultados desses estudos não indicam a “cura” da DAI pelo IAD/TACTH, mas mudanças clínicas e imunológicas na história natural da doença. Além disso, vale ressaltar que o “estado de auto-tolerância” alcançado após o transplante pode ser temporário (podendo durar de meses a vários anos) e ser revertido pelo contato do paciente com fatores desconhecidos desencadeadores da doença (261).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem avaliado a reconstituição imunológica em pacientes com DAIs após a terapia de IAD/TACTH, o que é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos imunológicos de ação desse tipo de tratamento.

1.5. Reconstituição imunológica após TACTH

Os primeiros meses após o TACTH estão associados a uma intensa linfopenia devida à imunossupressão em altas doses, caracterizada por alterações nos compartimentos celulares do sistema imunológico e consequente aumento da propensão ao desenvolvimento de infecções (234, 260, 262, 263).

Após o transplante, a reconstituição da imunidade inata ocorre primeiro que a reconstituição da imunidade adquirida (264-267). A contagem de monócitos e neutrófilos alcançam valores basais um mês após o transplante, seguidos pelas plaquetas e células NK (1 a 3 meses) (268), sendo a reconstituição das células dendríticas mais tardia, ocorrendo 3 meses após IAD (267).

Em geral, a reconstituição das células B precede a das células T em cerca de 1 a 2 anos após o transplante, sendo que a frequência de células B pode ser maior do que em indivíduos não-transplantados (265). Apesar do número de células B começarem a se estabilizar após 2-3 meses do transplante, a sua função (medida pela produção de imunoglobulinas no soro) pode demorar até dois anos para se normalizar, sobretudo a produção de IgA (264, 269).

Inicialmente, após o transplante de CTHs, a diversidade das células T circulantes é limitada, com predomínio de alguns poucos clones. Porém a diversidade do repertório de células T aumenta gradualmente durante 2-3 anos pós-TACTH, devido à reativação tímica e produção de novas células T *naïve* com diferentes especificidades e liberação para a periferia (235, 270).

A reconstituição das células T após IAD ocorre por dois mecanismos distintos, um timo-dependente e outro timo-independente, havendo um balanço dinâmico entre esses dois caminhos (271). Pelo mecanismo timo-independente ocorre expansão de células T *naïve* e de memória na periferia por proliferação homeostática (PH), principal mecanismo de reconstituição durante os iniciais (1-2 anos) pós-IAD/TACTH (251, 272, 273). No mecanismo timo-dependente ocorre a formação de novas células T *naïve* de origem tímica, avaliadas pela presença de "TCR *excision circles*" (TRECs), que são fragmentos de DNA excisados na forma de DNA circular gerados durante o rearranjo gênico do receptor da célula T e presentes nas células recém-geradas pelo timo.

A PH de células T pode ocorrer de forma lenta ou rápida, dependendo dos fatores desencadeadores envolvidos, tais como a afinidade de reconhecimento das células T por auto ou aloantígenos e a disponibilidade de citocinas (27, 274).

A PH lenta de células T *naïve* ocorre por reconhecimento alo, mas principalmente autoantigênico, com baixa afinidade e estímulo via IL-7 (273). Normalmente, em ambientes linfocompletos, esses sinais antigênicos inespecíficos são responsáveis pela manutenção da viabilidade celular, e servem de estímulos submitogênicos para que as células T *naïve* se mantenham funcionais até o contato com o antígeno para o qual são específicas (**Item 1.1**) (25, 275). Esses estímulos impedem a apoptose das células T *naïve* maduras promovendo a expressão de moléculas de sobrevivência, como Bcl-2 e Mcl-1, mas não são capazes de

induzir proliferação dessas células (276). Porém, em condições de linfopenia, os mesmos estímulos responsáveis pelos sinais de manutenção e viabilidade celular, são os mesmos capazes de induzir PH lenta de células T *naïve* (25, 274, 277). Esse fato deve-se principalmente ao excesso de IL-7 em ambientes linfopênicos, o que leva a uma diminuição no limiar de ativação e promove proliferação celular mesmo com estímulos de baixa afinidade (20, 274, 278, 279). Estudando camundongos geneticamente modificados, como os camundongos “*knockout*” para MHC ou deficientes de IL-7, diversos estudos demonstraram que nessas condições há o comprometimento da PH, não ocorrendo proliferação celular (280-283).

A PH rápida, ou espontânea (284, 285), de células T *naïve*, em contraste à PH lenta, ocorre de forma independente à IL-7, sendo guiada pelo forte reconhecimento auto ou aloantigênico específico (273).

Além da PH de células *naïve*, se observa em ambientes linfopênicos a PH de células T de memória. Ocorre com as células T de memória residuais que podem não ter sido eliminadas na etapa de condicionamento ou reinfundidas no transplante propriamente dito juntamente com as CTHs. O mecanismo de PH das células T de memória é diferente do das células T *naïve*, sendo independente de estímulo antigênico (286, 287) e dependente de IL-7 e IL-15 (20, 25). O reconhecimento auto ou aloantigênico com alta afinidade durante PH leva ao aumento da taxa de proliferação das células de memória (288).

Uma consequência importante da PH de células T *naïve* é a aquisição de fenótipo e funcionalidades de células de memória após proliferação (289-291). Como essas células T de memória (células *naïve* pós PH) não se diferenciam em células efetoras precursoras e apresentam diferenças sutis nos marcadores de ativação, elas são denominadas pseudo-memória ou “*memory-phenotype*” (MP) (273, 274, 292). Apesar dessa peculiaridade semântica, essas células MP possuem a mesma capacidade funcional das células de memória convencionais (293), com um fenótipo de memória estável a longo prazo (290, 294). Esses dados nos mostram que a PH não é capaz de re-expandir e/ou renovar o *pool* de células T *naïve* após linfodepleção, pois essas adquirem fenótipo e funcionalidade de células T de memória após proliferação.

Com isso, nos primeiros meses após o TACTH, a reconstituição imunológica é timo-independente, ocorrendo, sobretudo, o aumento de células T CD8⁺ de memória. Estudos indicam que as células T CD4⁺ são muito mais dependentes da produção tímica para sua reconstituição (257, 265). Portanto, sem reativação da produção tímica de novas células T *naïve* não é possível repovoar a periferia com um pool diverso e funcional dessas células. O

mecanismo de reconstituição timo-dependente de células T *naïve* após o TCTH demora em torno de 12 meses, período onde se observa números absolutos de células T *naïve* similares aos valores basais. A reconstituição timo-dependente depende de vários fatores, principalmente da idade do paciente (263, 295, 296). Dentre as células tímicas formadas no período de linfopenia, se encontram as células Tregs naturais, que constituem grande parte das células recém-imigradas do timo, principalmente quando há o uso de rATG para linfoablação (297, 298). Além da produção de novas células Tregs pelo timo, elas podem ser geradas na periferia de forma timo-independente, a partir de células T CD4⁺CD25⁻ (299) ou sofrer expansão (300).

A cinética da reconstituição imunológica é importante na predição de resposta terapêutica e taxa de mortalidade dos transplantes de medula óssea (301), principalmente nos alogênicos (302). Vários estudos têm mostrado que a quantidade e qualidade de reconstituição de diversas subpopulações celulares do sistema imune está correlacionada com os resultados clínicos a longo prazo, sobrevida dos pacientes, a ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro, infecções virais e taxa de recidiva, após o TCTH (303-311).

A reconstituição imunológica após IAD/TACTH tem sido largamente estudada no contexto de doenças hematológicas malignas (como nos casos de câncer do sistema hematopoético) (263, 301, 302), porém poucos estudos têm mostrado a reconstituição no contexto no transplante para DAIs (247, 260, 262, 263, 312-315). Além disso os estudos existentes avaliam superficialmente as populações de linfócitos T e B por um curto período de seguimento pós-transplante (média de 1-2 anos de acompanhamento clínico e imunofenotípico), sem relacionar a resposta clínica ao TACTH com as características qualitativas e quantitativas do novo sistema imune reconstituído.

Hipótese e justificativa do estudo

2. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os tratamentos atuais disponíveis para as DAIs são insatisfatórios e pouco eficazes no controle da progressão das mesmas, portanto novas abordagens terapêuticas precisam ser avaliadas, principalmente para os casos onde a terapêutica convencional não é mais eficaz no controle da progressão da doença (206-208).

Nos últimos anos, o aumento da experiência com o tratamento de pacientes com DAIs utilizando IAD/TACTH resultou em maior segurança do procedimento, maior eficácia terapêutica e consequente melhora da qualidade de vida dos pacientes (200-206, 209, 226). Portanto, atualmente, a IAD/TACTH constitui uma alternativa terapêutica promissora para as DAIs, impedindo a progressão da doença e/ou favorecendo o uso da terapêutica convencional em pacientes refratários (204, 206, 209, 217, 224, 225, 231-233, 235, 239, 316).

No entanto, existem ainda inúmeras questões não respondidas acerca dos mecanismos imunológicos de ação da terapia de IAD/TACTH em pacientes com DAIs, inclusive em pacientes com DM1 e EM. Estudos quantitativos e funcionais detalhados do novo sistema imunológico reconstituído pelas células-tronco hematopoéticas autólogas após o transplante são essenciais para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos de ação da IAD/TACTH no tratamento de DAIs, o que é necessário para melhoria dos protocolos clínicos e maior aplicação desta terapia no tratamento dessas doenças (204, 272).

Portanto, neste estudo avaliou-se a reconstituição imunológica das subpopulações de células T e B periféricas após a terapia de IAD/TACTH nos pacientes com DM1 e EM, com objetivo de revelar biomarcadores de resposta terapêutica envolvidos nesse tratamento. Nossa hipótese é que, após o tratamento com IAD/TACTH, os grupos de pacientes que exibiram uma melhor resposta clínica apresentariam linfopenia prolongada, menos células T de memória (potencialmente autorreativas), mais células T *naïve* e mais células T reguladoras e supressoras.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a reconstituição imunológica em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 e esclerose múltipla submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta clínica dos pacientes com DM1 e EM ao tratamento com IAD/TACH;
 2. Avaliar, antes e sequencialmente após o transplante, o número absoluto de várias subpopulações de células T e B do sangue periférico dos pacientes com DM1 que ficaram livres de insulina por um período maior ou igual a 3 anos, ou por um período menor que 3 anos;
 3. Avaliar, antes e sequencialmente após o transplante, o número absoluto de várias subpopulações de células T e B do sangue periférico dos pacientes com EM que responderam ou não responderam ao transplante;
 4. Comparar o número absoluto das subpopulações de células T e B do sangue periférico dos pacientes com DM1 que ficaram livres de insulina por um período maior ou igual a 3 anos com os livres por um período menor que 3 anos, nos mesmos períodos pré ou pós-transplante;
 5. Comparar o número absoluto das subpopulações de células T e B do sangue periférico dos pacientes com EM que responderam com os que não responderam ao transplante, nos mesmos períodos pré ou pós-transplante.
-

Casuística, materiais e métodos

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo conduzido com o objetivo de avaliar a reconstituição imunológica em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1; N=21) ou esclerose múltipla (EM; N=37) submetidos ao tratamento com IAD/TACTH, na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Os pacientes foram transplantados no período de março de 2004 a agosto de 2009 e acompanhados até setembro de 2012 (EM) e abril de 2013 (DM1). Foram colhidas amostras de sangue periférico dos pacientes nos seguintes períodos: pré-transplante e aos 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 meses pós-transplante. O número absoluto de várias subpopulações de células T e B do sangue periférico foi quantificado pela técnica de citometria de fluxo. Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CEPID-FAPESP) do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) em colaboração com a Unidade de TMO do HC-FMRP-USP, o Setor de Doenças Neuromusculares e a Divisão de Endocrinologia e Metabolismo do HCFMRP.

4.2. Pacientes e controles

4.2.1. Pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1

Nesse estudo foram incluídos pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1; N=21) submetidos ao tratamento com IAD/TACTH na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Os pacientes foram transplantados no período de março de 2004 a agosto de 2009 e acompanhados até abril de 2013. Os dados clínico-demográficos dos pacientes antes do transplante encontram-se na **Tabela 1**. O protocolo de transplante específicos para DM1 foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Proc. 10095/02) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (RG 7160), e os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Nesse protocolo estão definidos os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.

Foram transplantados pacientes com diagnóstico clínico de DM1 recente (menos que 6 semanas do diagnóstico), que apresentavam hiperglicemia (glicose sérica >125 mg/dL) e positividade para anticorpos anti-GAD65 (anti-GAD65 sérico >1 UI/mL). Os pacientes que já tinham apresentado episódios de cetoacidose diabética antes do diagnóstico foram excluídos do protocolo (202, 203).

Foram avaliados 21 pacientes com DM1 (5 mulheres), com idade entre 15 e 31 anos (média de $18,3 \pm 4,4$) (**Tabela 1**), sendo 15 brancos, 1 negro, 4 birraciais e 1 asiático-americano, os quais foram submetidos à terapia de IAD/TACTH, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no período de março de 2004 a agosto de 2009 e acompanhados até abril de 2013 (última avaliação clínica e endocrinológica).

A dose inicial de insulina (utilizada pelos pacientes no período do diagnóstico e adesão ao estudo) variou de 0,12 a 0,58 UI/Kg/dia com média (DP) de 0,38 (0,14) UI/Kg/dia. A glicemia pré-transplante (glicemia de jejum de 8h no período do diagnóstico e adesão ao estudo) variou de 130 a 612 mg/dL com média (DP) de 368,5 (126,1) mg/dL. Os títulos de anticorpos anti-GAD65 no período do diagnóstico variou de 1,1 a 102 UI/mL com média (DP) de 24,8 (23,9) UI/mL (**Tabela 1**).

A resposta clínica dos pacientes com DM1 ao TACTH foi avaliada pela independência insulínica (controle glicêmico com glicemia de jejum de 8h < 100 mg/dL sem o uso de insulina) após o transplante (**Tabela 2**).

4.2.2. Pacientes com esclerose múltipla

Nesse estudo foram incluídos pacientes com esclerose múltipla (EM; N=37) submetidos ao tratamento com IAD/TACTH na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Os pacientes foram transplantados no período de maio de 2005 a março de 2009 e acompanhados até setembro de 2012. Os dados clínico-demográficos dos pacientes antes do transplante encontram-se na **Tabela 3**. O protocolo de transplante específico para EM foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Proc. 2693/2001) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Esclerose múltipla - RG 2944), e os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Nesse protocolo estão definidos os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.

Os pacientes com esclerose múltipla submetidos ao TACTH possuíam (A) diagnóstico clínico estabelecido de acordo com os critérios de Poser e colaboradores (140) a pelo menos um ano; (B) apresentavam formas progressivas da doença (formas progressiva secundária, progressiva primária ou surto-remissiva) (135) refratárias ao tratamento com corticosteróides e IFN- β ; e (C) EDSS entre 3,0 e 6,5, com progressão das incapacidades mantida por pelo menos seis meses nos últimos dois anos. A progressão foi classificada pela elevação de 1,5 ponto ou mais no EDSS (quando o EDSS inicial era entre 3,0 e 5,0) ou de 1,0 ponto ou mais (se o EDSS inicial era $\geq 5,5$). O EDSS constitui escala de medida da incapacidade mediante

avaliação das condições neurológicas e autonômicas do paciente, que varia de 0 (exame neurológico normal) a 10 (óbito) (**Anexo A**).

Foram incluídos nesse estudo 37 pacientes com EM (26 mulheres), com idade entre 20 e 55 anos (média de $39,1 \pm 9,8$) (**Tabela 3**), sendo 19 brancos e 18 mulatos, que foram submetidos à terapia de IAD/TACTH, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no período de maio de 2005 a março de 2009 e acompanhados até setembro de 2012 (última avaliação clínica e neurológica).

Entre os 37 pacientes, 28 tinham a forma de esclerose múltipla progressiva secundária (EM-PS), três apresentavam esclerose múltipla progressiva primária (EM-PP) e seis pacientes tinham a forma surto-remissiva da doença (EM-SR) (129, 134). O tempo da doença (data do primeiro surto até a última data da avaliação neurológica) variou de 6 a 38 anos, com média (DP) de 14,9 (6,7) anos. Os valores de EDSS variaram de 3,0 a 7,0, com média (DP) de 5,6 (1,2) e foram observadas lesões ativas por imagens de ressonância magnética (gadolínio positivas) em 5 dos pacientes avaliados (**Tabela 3**).

A resposta clínica dos pacientes com EM ao tratamento com IAD/TACTH foi avaliada pelo exame neurológico (valores de EDSS) conforme descrito por Saccardi e colaboradores (236). A elevação ou diminuição: (A) de 0,5 ponto no EDSS, quando o EDSS inicial era $\geq 5,5$; ou (B) de 1,0 ponto ou mais, se o EDSS inicial era $< 5,0$; entre o período pré-transplante e da última visita, foi considerada não-resposta ou resposta ao tratamento, respectivamente (**Tabela 4**).

4.2.3. Controles

Os grupos controle foram constituídos de indivíduos saudáveis que são doadores de repetição do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, para fins de obtenção de valores normais de referência. Todos os indivíduos saudáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da doação. O grupo controle utilizado como referência para comparar com os pacientes com DM1 foi constituído por 10 indivíduos saudáveis (6 mulheres), incluídos na faixa etária de 18 a 27 anos (média de $22,6 \pm 2,32$). O grupo controle utilizado como referência para comparar com os pacientes com EM foi constituído por 10 indivíduos (6 mulheres), incluídos na faixa etária de 31 a 45 anos (média de $37,91 \pm 6,89$).

Tabela 1: Características clínico-demográficas dos pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 no período pré-transplante.

Paciente	Sexo/ idade (anos)	Glicemia (mg/dL), Pré-TACTH	Anticorpo anti- GAD65 (UI/mL), Pré-TACTH	Dose inicial de insulina (UI/Kg/dia)	Data do transplante
ALSR	M/28	589	49.0	0.34	15.03.04
WLS	M/16	381	1.1	0.27	03.05.04
MGB	M/15	321	22.0	0.23	05.07.04
RLFS	M/16	404	51.0	0.38	03.02.05
CPS	M/16	504	17.0	0.42	03.05.05
TAS	F/20	391	4.0	0.44	25.05.05
RAOA	M/17	314	48.0	0.55	12.09.05
PMR	F/18	330	102.0	0.35	20.09.05
CTO	F/17	612	44.0	0.29	10.10.05
VTR	M/16	130	11.0	0.13	22.11.05
ISJ	F/15	581	11.0	0.45	03.05.06
RRS	M/24	269	24.0	0.58	05.06.06
JFA	M/31	273	37.0	0.37	17.07.06
LTF	M/17	291	21.1	0.44	28.08.06
FCC	M/15	384	5.3	0.56	20.07.07
HFG	M/18	236	12.0	0.21	10.08.07
TDP	M/15	324	7.0	0.59	10.08.07
GBA	M/15	485	29.0	0.49	09.10.07
TFK	F/15	390	10.0	0.33	31.03.08
MSGs	M/22	250	14	0.54	09.06.08
GEP	M/18	280	1.5	0.12	25.08.09
Média (DP)	18,3 (4,4)	368,5 (126,1)	24,8 (23,9)	0,38 (0,14)	

TACTH: transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; **M:** sexo masculino (n=16, 76%); **F:** sexo feminino (n=5, 24%); **Pré-TACTH:** período pré-transplante; **GAD65:** ácido glutâmico descarboxilase (Resultados foram considerados positivos se GAD65 > 1,0 UI/mL). Os anticorpos anti-GAD foram dosados no Laboratório de Diabetes e Metabolismo do HC-FMRP-USP.

Tabela 2: Avaliação da resposta clínica dos pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) até abril de 2013.

Paciente	Tempo pós-TACTH (Meses) ^a	Tempo livre de insulina (Meses)	Dose de insulina última visita (UI/Kg/dia)	Resposta clínica ^b
ALSR	106	47 (T)	0.16	≥ 3 anos
WLS	104	100 (C)	0	≥ 3 anos
MGB	104	43 (T)	0.24	≥ 3 anos
RLFS	95	94 (C)	0	≥ 3 anos
CPS	71*	60 (T)	0.44	≥ 3 anos
TAS	91	7 (T)	0.36	< 3 anos
RAOA	88	44 (T)	0.41	≥ 3 anos
PMR	88	61 (T)	0.40	≥ 3 anos
CTO	87	9 (T)	0.26	< 3 anos
VTR	15*	12 (T)	0.34	< 3 anos
ISJ	80	66 (T)	0.33	≥ 3 anos
RRS	79	67(T)	0.11	≥ 3 anos
JFA	78	66(T)	0.20	≥ 3 anos
LTF	77	9 (T)	0.25	< 3 anos
FCC	66	30 (T)	0.30	< 3 anos
HFG	65	64 (C)	0	≥ 3 anos
TDP	38*	23 (T)	0.18	< 3 anos
GBA	61	15 (T)	0.62	< 3 anos
TFK	57	9 (T)	0.80	< 3 anos
MSGs	55	6 (T)	0.30	< 3 anos
GEP	45	7 (T)	0.38	< 3 anos
Média (DP)	73,8 (23,2)	# / §	0,29 (0,19)	Δ

TACTH: transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; ^a: tempo avaliado desde o regime de mobilização; ^b: baseada na independência insulínica após TACTH; *: perda do acompanhamento; **C:** continuamente livre de insulina; **T:** transientemente livre de insulina; **#:** Para o grupo livre de insulina de forma contínua (C), média (DP) de 86 (19,3) meses, e para o grupo transientemente livre de insulina (T), média (DP) de 32,3 (24,2); **§:** Para o grupo livre de insulina ≥ 3 anos a média (DP) foi de 64,7 (18,3) meses, e para o grupo livre de insulina < 3 anos, a média (DP) foi de 12,7 (7,9) meses; **Δ:** Livre de insulina ≥ 3 anos (n=11; 52%) e livre de insulina < 3 anos (n=10; 48%).

Tabela 3: Características clínico-demográficas dos pacientes com esclerose múltipla no período pré-transplante.

Paciente	Sexo/ idade (anos)	Forma clínica	Temo de doença (anos) ^a	EDSS pré- TACTH	RMN pré- TACTH	Data do transplante
SHC	F/43	PS	34	6,5	Gd-	11.05.05
RPS	M/54	PS	16	6,5	Gd-	21.06.05
CMBM	F/36	PS	21	6,5	Gd-	24.08.05
LFL	F/32	PS	13	6,0	Gd-	23.08.05
LBSL	F/42	PS	17	6,0	Gd-	20.10.05
CC	M/49	PP	17	6,5	Gd-	04.11.05
LCG	F/38	PP	15	6,5	Gd-	01.02.06
MAFC	F/48	PS	17	4,5	Gd-	10.06.05
KSN	F/36	PS	18	5,0	Gd-	21.06.05
JHRF	M/33	PS	17	6,5	Gd+	11.04.06
JGSB	F/31	PS	12	6,5	Gd+	23.03.06
MJ	M/40	PS	10	5,5	Gd+	18.04.06
FLDT	F/42	PS	12	6,5	Gd+	08.05.06
LAS	M/49	SR	38	3,0	Gd-	22.05.06
CVMS	F/32	PS	13	6,0	Gd-	04.07.06
RRA	F/38	SR	7	4,5	Gd-	26.09.06
AAI	M/55	PS	18	3,5	Gd-	08.08.06
OKS	M/49	SR	11	4,0	Gd-	04.09.06
SGR	F/40	PS	14	6,0	Gd-	09.10.06
ALPN	F/41	PS	16	6,0	Gd-	13.11.06
CAL	M/43	PS	9	6,0	Gd-	19.03.07
JAP	M/45	PS	15	5,5	Gd-	09.04.07
SBPP	F/41	SR	8	3,0	Gd-	11.04.07
UBF	M/44	PS	14	6,5	Gd-	27.08.07
JGMS	F/22	SR	9	3,0	Gd-	31.10.07
MLG	F/26	PS	9	6,5	Gd-	13.11.07
MVCP	F/33	PS	23	6,5	Gd-	04.12.07
CSFO	F/48	PS	11	6,0	Gd-	08.01.08
AMGA	F/39	PS	10	6,5	Gd+	19.03.08
KAS	F/20	PS	13	5,5	Gd-	10.03.08
MOM	F/21	PS	11	6,0	Gd-	09.04.08
RC	F/43	PS	20	6,5	Gd-	06.05.08
MLS	F/24	PS	9	7,0	Gd-	02.07.08
IMFG	F/43	PP	14	6,5	Gd-	01.10.08
MLS	F/53	PS	10	6,5	Gd-	18.11.08
DGR	M/21	PS	6	6,0	Gd-	01.12.08
MFSD	F/54	SR	24	3,0	Gd-	09.03.09
Média (DP)	39,1 (9,8)	*	14,9 (6,7)	5,6 (1,2)	#	

TACTH: transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; **EDSS:** "Expanded Disability Status Score"; **RMN:** ressonância magnética nuclear; **Gd+:** gadolínio positivas, presença de lesões de atividade; **M:** sexo masculino (n=11, 30%); **F:** sexo feminino (n=26, 70%); **Pré-TACTH:** período pré-transplante; **PS:** progressiva secundária; **PP:** progressiva primária; **SR:** surto-remissiva; ^a: tempo do primeiro surto até a última avaliação clínica (setembro de 2012); *: PS (n=28, 75%), PP (n=3, 9%) e SR (n=6, 16%); #: Gd+ (n=5, 14%) e Gd- (n=32, 86%).

Tabela 4: Avaliação neurológica e resposta clínica dos pacientes com esclerose múltipla (EM) após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) até setembro de 2012.

Paciente	Tempo pós-TACTH (Meses) ^a	EDSS pré-TACTH	Último EDSS pós-TACTH	Resposta clínica pós-TACTH	Resposta clínica ^b
SHC	89	6,5	7,0	Progressão	Não-respondedor
RPS	88	6,5	6,0	Remissão clínica	Respondedor
CMBM	85	6,5	9,5	Progressão	Não-respondedor
LFL	86	6,0	6,0	Estabilização	Respondedor
LBSL	84	6,0	6,0	Estabilização	Respondedor
CC	83	6,5	7,5	Progressão	Não-respondedor
LCG	80	6,5	6,5	Estabilização	Respondedor
MAFC	88	4,5	4,0	Estabilização	Respondedor
KSN	88	5,0	2,5	Remissão clínica	Respondedor
JHRF	78	6,5	7,5	Progressão	Não-respondedor
JGSB	78	6,5	6,0	Remissão clínica	Respondedor
MJ	78	5,5	4,5	Remissão clínica	Respondedor
FLDT	77	6,5	6,0	Remissão clínica	Respondedor
LAS	76	3,0	4,0	Progressão	Não-respondedor
CVMS	75	6,0	6,5	Progressão	Não-respondedor
RRA	72	4,5	4,5	Estabilização	Respondedor
AAI	74	3,5	5,0	Progressão	Não-respondedor
OKS	73	4,0	6,0	Progressão	Não-respondedor
SGR	72	6,0	6,5	Progressão	Não-respondedor
ALPN	71	6,0	6,5	Progressão	Não-respondedor
CAL	66	6,0	4,5	Remissão clínica	Respondedor
JAP	66	5,5	5,5	Estabilização	Respondedor
SBPP	66	3,0	3,0	Estabilização	Respondedor
UBF	61	6,5	7,0	Progressão	Não-respondedor
JGMS	59	3,0	3,0	Estabilização	Respondedor
MLG	58	6,5	7,0	Progressão	Não-respondedor
MVCP	58	6,5	7,0	Progressão	Não-respondedor
CSFO	57	6,0	5,0	Remissão clínica	Respondedor
AMGA	54	6,5	7,0	Progressão	Não-respondedor
KAS	55	5,5	3,5	Remissão clínica	Respondedor
MOM	54	6,0	6,0	Estabilização	Respondedor
RC	53	6,5	6,5	Estabilização	Respondedor
MLS	51	7,0	7,5	Progressão	Não-respondedor
IMFG	48	6,5	6,0	Remissão clínica	Respondedor
MLS	46	6,5	4,0	Remissão clínica	Respondedor
DGR	46	6,0	4,5	Remissão clínica	Respondedor
MFSD	42	3,0	3,0	Estabilização	Respondedor
Média (DP)	69,3 (13,1)	5,6 (1,2)	5,6 (1,5)	*	#

TACTH: transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; **Pré-TACTH:** período pré-transplante; ^a: tempo avaliado desde o transplante; ^b: baseado no valor de EDSS da última visita; **EDSS:** "Expanded Disability Status Score"; **RMN:** ressonância magnética nuclear; **Progressão:** aumento de 0,5 ponto ou mais no EDSS (quando EDSS inicial $\geq 5,5$) ou de 1,0 ponto ou mais (quando EDSS inicial $< 5,0$), entre o período pré-TACTH e da última visita; **Estabilização:** não alteração do EDSS entre os períodos; **Remissão clínica:** diminuição de 0,5 ponto ou mais no EDSS (quando EDSS inicial $\geq 5,5$) ou de 1,0 ponto ou mais (quando EDSS inicial $< 5,0$), entre o período pré-TACTH e da última visita; *: progressão (n=15, 40%), estabilização (n=11, 30%) e remissão clínica (n=11, 30%); #: pacientes respondedores (n=15, 40%) e não-respondedores (n=22, 60%).

4.3. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

O esquema da terapia de imunossupressão seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (IAD/TACTH) foi constituído por quatro etapas: 1) etapa de mobilização das CTHs da medula óssea para o sangue periférico; 2) fase de condicionamento, constituída pela administração de medicações imunossupressoras para imunoablação; 3) infusão das CTHs autólogas ou, transplante propriamente dito; e 4) seguimento clínico e imunológico dos pacientes nos períodos pós- transplante.

4.3.1. Mobilização das células-tronco hematopoéticas

As CTHs foram mobilizadas da medula óssea para o sangue periférico utilizando ciclofosfamida e fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) (Leucin, *Laboratory Bergamo*, São Paulo, Brasil). A ciclofosfamida (2 g/m²) foi infundida em 2 doses (1g/m²/dose), com 12h de intervalo em 250 mL de solução salina, durante 1 hora. O G-CSF (10 µg/Kg/dia) foi administrado subcutâneamente no primeiro dia após a infusão de ciclofosfamida e continuado até o término da leucoaférese. O início da coleta foi determinado pela contagem de leucócitos e de células CD34⁺ no sangue periférico (aproximadamente 8 dias após o início da mobilização): leucócitos >1000/mm³ e células CD34⁺ >10 células/mm³. A aférese foi realizada uma ou duas vezes até atingir o valor mínimo de 3,0 x 10⁶ CD34⁺/Kg de peso. Após a coleta, as CTHs autólogas foram criopreservadas em 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, *Sigma-Aldrich*, Steinhein, Alemanha) e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do transplante. O esquema de mobilização foi o mesmo para ambas as doenças.

4.3.2. Fase de condicionamento

A fase de condicionamento foi constituída pela administração de medicamentos imunossupressoras, ciclofosfamida em altas doses e globulina antitimocitária (ATG), para depleção *in vivo* de linfócitos B e T nos pacientes.

Para ambas as doenças o esquema de condicionamento adotado foi o mesmo. A ciclofosfamida foi administrada intravenosamente dividida em quatro doses de 50 mg/Kg/dia, durante 1 hora, nos dias -5, -4, -3 e -2 antes da infusão das CTHs. A ATG de coelho (*Thymoglobulin, Genzyme Polyclonals SAF*, Marcy l'Etoile, France) foi administrada na dose de 0,5 mg/Kg/dia no dia -5, e na dose de 1 mg/Kg/dia nos dias -4, -3, -2 e -1 antes da infusão das CTHs.

4.3.3. Infusão das células-tronco hematopoéticas

A infusão das CTHs ocorreu no dia 0, data em que o transplante foi realizado. Foram administrados G-CSF (5 µg/Kg/dia) subcutâneamente do dia +5 pós-transplante até o dia no qual a contagem de neutrófilos atingisse valor $>1000/\text{mm}^3$. Na maioria dos pacientes, foi infundida a quantidade total de células CD34⁺ coletadas.

A enxertia da medula após o TACTH foi definida como: **1**, enxertia de leucócitos: primeiro dia entre três dias consecutivos em que o número de neutrófilos foi >500 células/µL; **2**, enxertia de plaquetas: primeiro dia em que o número de plaquetas foi >20.000 /µL, sem que o paciente tenha recebido infusão de plaquetas nos últimos 7 dias.

4.3.4. Seguimento do pacientes após o transplante

Os pacientes permaneceram internados na Unidade de TMO do HCFMRP-USP até a enxertia e em seguimento ambulatorial intensivo no Hospital-Dia até aproximadamente 60 dias após o transplante. Após esse período, os pacientes retornaram às suas residências e compareceram a consultas periódicas de acompanhamento no ambulatório da Unidade de TMO do HCFMRP-USP.

Foram colhidas amostras de sangue periférico dos pacientes nos seguintes períodos: pré-mobilização (basal ou pré-transplante) e aos 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 meses pós-transplante. As coletas das amostras de sangue periférico foram adaptadas aos retornos dos pacientes ao hospital após o transplante. Portanto, nem sempre a data das coletas coincidiram exatamente com as datas programadas citadas anteriormente. Além disso, nem todos os pacientes possuem amostras coletadas de todos os períodos citados acima, devido principalmente ao estado clínico do paciente ou ao não comparecimento do paciente aos retornos determinados.

4.4. Imunofenotipagem das subpopulações celulares no sangue periférico

Amostras de 5 mL sangue periférico dos pacientes pré ou pós-TACTH foram coletadas na presença de EDTA (8.55 mg/tubo) para a realização de contagens hematológicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo. As contagens hematológicas foram realizadas em contador de células automático (*Coulter, Beckman Coulter Inc.*, Miami, USA) para obtenção do número absoluto de glóbulos brancos, linfócitos, monócitos e granulócitos.

Alíquotas de 150 µL de sangue periférico total foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente (TA) no escuro com 5 µL de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC),

ficoeritrina (PE), *Peridinin chlorophyll Protein* (PercP) ou ficoeritrina-CY5 (PE-CY5), adquiridos da *Becton-Dickinson* (San Diego, CA, USA) ou *Pharmingen* (BD Bioscience, San Diego, CA, USA), e previamente titulados.

Foram feitas marcações duplas ou triplas para a análise das diversas subpopulações linfocitárias. Em seguida as amostras de sangue foram incubadas com 1 mL de solução de fixação e lise (*FACs lysing solution*, *Becton-Dickinson*, San Diego, CA, USA) por 10 minutos a TA, para fixação das células e lise dos eritrócitos. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 500 g, lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS, 0.2% de soro bovino fetal, 0.02% de azida sódica), ressuspensas em 200 µL de tampão FACS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (*Becton-Dickinson*, San Diego, CA, USA). Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência.

Para a realização da marcação de fatores de transcrição (*e.g.*, FOXP3) no interior das células, as mesmas, após marcação intracelular conforme citada acima (*e.g.*, anti-CD4 e anti-CD25, no caso das células T reguladoras), as células foram incubadas com 300 µL de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD, San Diego, CA, USA) e incubadas por 10 minutos a TA. Após lavagem com tampão FACS, as células foram incubadas com 5 µL de anticorpos monoclonais específicos ou isotipos controles intracelulares diretamente conjugados a fluorocromos por 30 minutos a TA. As células foram então lavadas novamente, ressuspensas em 200 µL de tampão FACS e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (*Becton-Dickinson*, San Diego, CA, USA).

Controles isotípicos (IgG1-FITC, IgG2a-PE e IgG1-Percp) foram incluídos em todos os experimentos para determinação de reação inespecífica nas marcações extracelulares e/ou intracelulares.

As seguintes subpopulações linfocitárias foram analisadas: CD3⁺ (linfócitos T totais), CD3⁺CD4⁺ (linfócitos T “*helper*” ou auxiliares), CD3⁺CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), CD19⁺ (linfócitos B), CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (linfócitos T auxiliares virgens, recém-imigrados do timo), CD4⁺(CD8⁺)CD27⁺CD45RO⁻ (linfócitos T *naïve*), CD4⁺(CD8⁺)CD27⁺CD45RO⁺ (linfócitos T de memória central), CD4⁺(CD8⁺)CD27⁻CD45RO⁺ (linfócitos T de memória efetora), CD8⁺CD28⁻ (células T supressoras) e CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ (células T reguladoras).

Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Foram adquiridos 30.000 eventos/amostra nas marcações extracelulares e 100.000 eventos/amostra nas marcações intracelulares. As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest*

(*Becton-Dickinson*, San Diego, CA, USA) e *FlowJo* (*TreeStar Inc.*, Ashland, OR, USA). As células mortas foram excluídas por tamanho e granulidade.

As diversas subpopulações celulares foram analisadas usando-se dois, três ou quatro tipos de fluorocromos. No caso de marcações duplas, os eventos da *gate* de linfócitos (R1) foram analisados usando marcação com diferentes anticorpos por *dot plots* de fluorescência 1 (FL1, FITC - isotiocianato de fluoresceína) *versus* fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina). Para marcações quádruplas, foi selecionada uma determinada subpopulação por uma *gate* R2 na população duplo-positiva (por exemplo, FL1 *versus* FL2), e a marcação de fluorescência avaliada por fluorescência 3 (FL2, PercP ou PE-CY5) *versus* fluorescência 4 (FL4, APC) (**Figura A.1** e **Figura A.2**).

No caso de marcações triplas, foram feitos *dot plots* de FL1 *versus* FL2 da *gate* R1, em seguida foi desenhada uma *gate* R2 na população duplo-positiva. A marcação de fluorescência 3 (FL3, PercP ou PE-CY5) nessa *gate* R2 foi representada por um histograma de FL3 (**Figura A.3**).

Exemplos dessas análises de experimentos de imunofenotipagem por citometria de fluxo encontram-se representadas no **Apêndice A**.

Os resultados das análises de imunofenotipagem foram expressos em valores absolutos que foram calculados multiplicando-se o valor da porcentagem obtida pelo número de linfócitos/ μL (determinado pelas contagens hematológicas da amostra de sangue periférico).

4.5. Análise estatística

Para as comparações foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (317). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tem distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Nas situações em que tal pressuposto não foi observado, transformação logarítmica na variável resposta foram utilizadas. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS (*SAS/STAT® User's Guide, Version 8.02, SAS Institute Inc., 1999, Cary, Carolina do Norte, EUA*). Para as comparações foi utilizado o pós-teste por contrastes ortogonais.

Os *box-plots* e demais figuras foram preparados utilizando o software estatístico *GraphPad® Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., USA*). Os *box-plots* foram utilizados para

representar os dados da reconstituição de todos os pacientes agrupados independentemente da resposta clínica (**Apêndice B e C**), onde as extremidades das caixas indicam o primeiro (Q1 ou *lower quartile*) e terceiro quartis (Q3 ou *upper quartile*), a linha dentro das caixas indica a mediana (Q2) e as barras se estendem do valor máximo ao mínimo, abrangendo 100% da população avaliada, incluindo-se os *outliers*. Os gráficos de linhas com as médias conectadas foram utilizadas para representar os dados da reconstituição dos pacientes agrupados por resposta clínica, sendo os valores representados como média $\pm$ DP.

As diferenças entre os valores pré-transplante *versus* todos os outros períodos pós-transplante, ou entre os valores dos diferentes grupos clínicos no mesmo período, foram consideradas estatisticamente significativas quando p valor menor que 5% ($p < 0,05$). Os valores pré-transplante e períodos pós-transplante não foram comparados com os grupos controles, sendo esses valores utilizados apenas como valores normais de referência.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Resultados clínicos

5.1.1. Diabetes *mellitus* tipo 1

No período de março de 2004 a agosto de 2009 foram transplantados 21 pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) recém-diagnosticados, os quais foram acompanhados clínica e imunologicamente até abril de 2013. Os dados clínicos pré e pós-TACTH para DM1 estão sumarizados nas **Tabelas 1 e 2**, respectivamente.

Os pacientes tiveram seguimentos de 15 a 106 meses pós-TACTH, sendo observados durante esses períodos os efeitos adversos da terapia e a resposta clínica (insulino-independência). O tempo médio de seguimento (DP) foi de 73,8 (23,2) meses (**Tabela 2**).

Foram observados alguns efeitos colaterais leves associados à terapia de IAD/TACTH, tais como náusea, vômitos e febre. Outros efeitos adversos mais graves (*e.g.*, doença de Graves, rabdomiólise, hipotireoidismo autoimune) foram observados em poucos pacientes e de forma transiente, desaparecendo após tratamento específico. Não houve óbitos.

A necessidade de insulina exógena diminuiu progressivamente com o tempo, e suspensão da insulina ocorreu nesses pacientes entre os dias -6 e +34 após o transplante (média + 2,9 dias). Os 21 pacientes avaliados alcançaram a independência insulínica por períodos variáveis de tempo, 18 transitoriamente (85,7%) e 3 continuamente (14,3 %) após o transplante, sendo que a dose de insulina utilizada na última visita variou de 0 a 0,80 UI/Kg/dia, com média (DP) de 0,29 (0,19) UI/Kg/dia (**Tabela 2**).

Os níveis de autoanticorpos anti-GAD65 foram avaliados em todos os pacientes antes do transplante e em sete pacientes seis meses após o TACTH (dados não mostrados). Os níveis de anti-GAD65 diminuíram em quatro pacientes transplantados, não foram alterados em um paciente, aumentaram em um paciente e se negativaram em outro.

Os níveis de peptídeo-C (relacionado à massa de células β pancreáticas) foram dosados pré e em vários períodos pós-transplante (**Anexo B**). De maneira geral, os valores de peptídeo-C aumentaram significativamente nos pacientes após o transplante.

Após transplante os pacientes foram divididos, conforme resposta terapêutica (período de tempo livre de insulina), em 2 grupos: livre de insulina por período menor de 3 anos (< 3 anos) (N=10; 47,6%) e livres de insulina por um período maior ou igual a 3 anos ($\geq$ 3 anos) (N=11; 52,4%) (**Tabela 2**).

O objetivo principal do trabalho é a avaliação da reconstituição diferencial entre os grupos clínicos analisados em busca de biomarcadores de prognóstico ou de resposta terapêutica. No entanto, os resultados da reconstituição de todos os pacientes juntos nos

fornece uma visão geral sobre cinética de reconstituição imunológica nos pacientes com DM1 após o IAD/TACTH. Portanto, os resultados da reconstituição imunológica foram expressos avaliando os pacientes todos juntos (N= 21) (**Anexo B**) ou divididos em dois grupos conforme a resposta clínica (**Item 5.2.1**).

5.1.2. Esclerose múltipla

No período de maio de 2005 a março de 2009 foram transplantados 37 pacientes com esclerose múltipla grave progressiva refratária à terapêutica convencional os quais foram acompanhados clínica e imunologicamente até setembro de 2012. Os dados clínicos pré e pós-TACTH para EM estão sumarizados nas **Tabelas 3 e 4**, respectivamente.

Os pacientes tiveram seguimento de 42 a 89 meses pós-TACTH, sendo observados efeitos adversos da terapia e a redução ou estabilização do EDSS. O tempo médio de acompanhamento (DP) foi de 69,3 (13,1) meses. Os valores do EDSS da última avaliação pós-TACTH variaram de 3,0 a 9,5, com média (DP) de 5,6 (1,5) (**Tabela 4**).

Foram observados alguns efeitos colaterais leves associados à terapia de IAD/TACTH, tais como náusea, vômitos e febre. Não houve óbitos.

Após o transplante, os pacientes não apresentaram ocorrência de novas lesões inflamatórias agudas no tecido nervoso (lesões de atividade), detectadas através de imagens de ressonância magnética por captura de gadolínio. Por outro lado, houve a permanência de lesões desmielinizantes sequelares antigas já encontradas nos pacientes antes do transplante. Observou-se progressão neurológica, com consequente aumento do EDSS, em 15 pacientes dos 37 pacientes com EM transplantados e avaliados (**Tabela 4**).

Os pacientes com EM foram divididos em dois grupos, para a avaliação diferencial da reconstituição imunológica, de acordo com a resposta clínica pós-TACTH: (A) pacientes respondedores ao tratamento (N=22, 60%), que apresentaram diminuição ou estabilização dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente melhora das funções motoras e da qualidade de vida; (B) pacientes não-respondedores ao tratamento (N=15, 40%), que apresentaram aumento dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente progressão da doença (**Tabela 4**).

Os resultados da reconstituição imunológica foram expressos avaliando os pacientes todos juntos (N= 37) (**Anexo C**) ou divididos em dois grupos conforme a resposta clínica (**Item 5.2.2**).

5.2. Reconstituição imunológica

Após a imunossupressão em altas doses (condicionamento) seguida pelo TACTH, uma linfopenia intensa ocorreu em todos os pacientes, que pode ser observada pelo número de linfócitos totais no sangue periférico dos mesmos nos períodos iniciais após o transplante (**Figura B.1** e **Figura C.1**). Em seguida, houve a reconstituição das subpopulações celulares do sistema imunológico e hematopoético a partir das CTHs autólogas infundidas ou residuais nos pacientes. As células residuais (não-CTHs) que eventualmente sobreviveram ao regime de condicionamento ou que foram reinfundidas juntamente com as células CTHs no período do transplante propriamente dito, também participam da reconstituição do sistema imunológico. A enxertia da medula óssea ocorreu em todos os pacientes analisados entre os dias +6 e +15 após o transplante.

Com o objetivo de avaliarmos a reconstituição imunológica nos pacientes após o TACTH, quantificamos o valor absoluto (células/ μ L) de diversas subpopulações celulares do sangue periférico através de imunofenotipagem por citometria de fluxo, conforme descrito em **Casuística, materiais e métodos (Item 4)**, nos seguintes períodos: pré-transplante (pré), e em vários períodos após o transplante (meses pós-transplante). Os valores absolutos de linfócitos totais foram obtidos pela contagem hematológica realizada em contador automático e utilizados nos cálculos dos números absolutos de células.

Foram analisados dois grupos controles constituídos por indivíduos saudáveis para estabelecer os valores de referência. Os valores de referência do grupo 1 (N=10, idade < 30 anos) foram usados para comparação com os resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com DM1, enquanto os valores de referência do grupo 2 (N=10, idade > 30 anos) foram usados para comparação com os resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com EM (**Item 4.2.3**), uma vez que a frequência das diversas subpopulações celulares do sangue periférico varia consideravelmente nos indivíduos de acordo com a idade (318).

Os resultados da reconstituição imunológicas dos pacientes com DM1 e EM estão mostrados separadamente nos **Itens 5.2.1** e **5.2.2**, respectivamente.

5.2.1. Diabetes *mellitus* tipo 1

5.2.1.1. Reconstituição de linfócitos T e B

Inicialmente, avaliou-se aspectos básicos da reconstituição imunológica pelos números de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T (CD3⁺ totais, CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B CD19⁺.

O número de linfócitos totais diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em relação ao período pré-transplante, nos períodos 2-12 e 24 meses pós-transplante (**Figura B.1A**). A reconstituição do número basal (pré-transplante) de linfócitos totais dos grupos livres de insulina < 3 e ≥ 3 anos ocorreu aos 18 e 30 meses pós-transplante respectivamente, sendo que o grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou mais períodos (2-12 e 24 meses pós-TACTH) com diminuição significativa de linfócitos totais, ou seja, intensa linfopenia, do que o grupo livre de insulina < 3 anos (6 e 12 meses pós-TACTH) (**Figura 1A**).

Houve uma diminuição estatisticamente significativa do número absoluto de linfócitos T CD3⁺ nos períodos 2-30 e 42-60 meses após o IAD/TACTH, sendo observada a reconstituição do número basal de linfócitos T CD3⁺ somente no período 66 meses após o transplante (**Figura B.1B**). Ao analisar-se os pacientes divididos em grupos clínicos, não foi observada a recuperação total do número basal de células T CD3⁺ durante todo o seguimento avaliado (**Figura 1B**). O grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou mais períodos de linfopenia de células T CD3⁺ (2-30 e 42-60 meses pós-TACTH) que o grupo livre de insulina < 3 anos (6, 12, 24, 30, 42 e 60 meses de pós-TACTH), o que corrobora os dados da **Figura 1A** e a resposta clínica observada.

A reconstituição de células B CD19⁺ foi mais rápida do que a das células T CD3⁺, sendo inferior ao período pré-transplante apenas nos períodos 2, 6, 60 e 66 meses pós-transplante (**Figura B.1C**). Quando os pacientes foram divididos em grupos clínicos, observou-se uma diminuição significativa do número absoluto de células B CD19⁺ no grupo livre de insulina ≥ 3 anos apenas aos 60 meses pós-transplante, em relação ao período pré-transplante (**Figura 1C**). O grupo livre de insulina < 3 anos apresentou uma diminuição dessa subpopulação nos períodos 6, 12 e 60 meses pós-TACTH. Quando comparados, o grupo livre de insulina < 3 anos apresentou número significativamente menor de células B CD19⁺ do que o grupo livre de insulina ≥ 3 anos aos 6 e 30 meses de pós-transplante.

Após o transplante, ocorreu uma diminuição acentuada de linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺ em todos os seguimentos pós-TACTH avaliados ($p < 0,05$) e um aumento marcante de linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ pós-TACTH nos períodos iniciais após o transplante (2 e 3 meses pós-TACTH) (**Figura B.2A** e **Figura B.2B**). Não observou-se a recuperação do número basal das células T CD3⁺CD4⁺ durante todo o período avaliado (**Figura B.2A**), em nenhum dos grupos clínicos (**Figura 2A**). O número de células T CD3⁺CD8⁺ diminuiu apenas no grupo livre de insulina < 3 anos no período de 60 meses pós-TACTH quando comparado ao período pré-transplante (**Figura 2B**). O grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou maior número de células T CD3⁺CD8⁺ do que o grupo livre de insulina < 3 anos nos períodos 36 e

60 meses pós-TACTH. A diminuição da subpopulação de células T $CD3^+CD4^+$ e o aumento das células T $CD3^+CD8^+$ resultou na inversão da razão $CD3^+CD4^+:CD3^+CD8^+$ até 54 e aos 72 meses após o transplante (**Figura B.2C**). O mesmo foi observado para o grupo livre de insulina < 3 anos até 30 e 42 meses após o transplante (**Figura 2C**). O grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou inversão da razão $CD3^+CD4^+:CD3^+CD8^+$ até 42 meses pós-transplante, demonstrando valores menores do que grupo livre de insulina < 3 anos aos 9 e 36 meses pós-TACTH.

Figura 1. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos totais (A), linfócitos T $\text{CD}3^+$ (B) e linfócitos B $\text{CD}19^+$ (C). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e ≥ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 2. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μ L) de linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺ (A) e linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ (B). (C) Razão dos valores absolutos de linfócitos T CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺. Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo $\geq$ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e $\geq$ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.1.2. Reconstituição de células T *naïve*, de memória e células T recém-imigradas do timo

Com o objetivo de avaliar o efeito do TACTH nas subpopulações de linfócitos T *naïve* e de memória, usamos marcadores fenotípicos que permitem distinguir vários estágios de diferenciação funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esses estágios incluem linfócitos T *naïve* CD27⁺CD45RO⁻, linfócitos T de memória central CD27⁺CD45RO⁺ e linfócitos T de memória efetora CD27⁻CD45RO⁺ (201, 319-323).

Primeiramente, para avaliar a hipótese de que a reativação tímica pós-IAD/TACTH e consequente produção de novas células T *naïve* resultaria numa maior diversidade do repertório das células T e consequente melhor resposta clínica, foi realizada a quantificação das subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺ *naïve*.

Em nosso estudo, observou-se lenta reconstituição dos linfócitos T *naïve* CD4⁺ e CD8⁺, estando os números absolutos dessas subpopulações estatisticamente diminuídos em relação ao pré-transplante até 42 e 60 meses após TACTH, respectivamente (**Figura B.3A** e **Figura B.3B**). Quando os pacientes foram divididos de acordo com a resposta clínica, observou-se reconstituição dos números basais das subpopulações de células T *naïve* a partir de 30 e 36 meses pós-TACTH nos grupos livres de insulina < e ≥ 3 anos respectivamente (**Figura 3A** e **Figura 3B**). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos clínicos.

A reconstituição de células T CD4⁺ recém-imigradas do timo após o TACTH também foi avaliada. Não existem marcadores fenotípicos específicos para células recém-imigrantes do timo, mas foi demonstrado (324) que o subgrupo de células T CD4⁺CD45RA⁺ que co-expressa o marcador CD31 apresenta elevados níveis de TRECs.

A **Figura B.3C** mostra que o número de células T CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ diminuiu praticamente em todos os períodos avaliados após o TACTH (p<0,05 nos meses 2-48, 60 e 72 pós-transplante), em relação ao período pré-transplante. A partir de 9 meses pós-transplante, o número dessas células apresentou uma tendência a aumentar, sugerindo a reativação da produção tímica de células T *naïve* nesse período. Porém durante os 6 anos de seguimento pós-TACTH não foi observada recuperação dessa subpopulação no sangue periférico. Ao avaliar-se a reconstituição por grupos divididos de acordo com a resposta clínica, notou-se que em ambos os grupos ocorreu a diminuição da frequência dessa subpopulação, estando estatisticamente diminuída nos períodos 2-6, 12, 36 e 60 no grupo livre de insulina < 3 anos, e nos períodos 2-24, 42, 48 e 60 no grupo livre de insulina ≥ 3 anos, quando comparados ao período pré-TACTH. Vale ressaltar que o grupo de melhor resposta

clínica (livre de insulina ≥ 3 anos) apresentou números maiores de células T RIT no período de 60 meses pós-transplante quando comparado ao grupo livre de insulina < 3 anos (**Figura 3C**).

Para avaliar a hipótese de que um dos mecanismos imunológicos da eficácia terapêutica da IAD/TACTH seria a eliminação das células de memória, quantificou-se a reconstituição das subpopulações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de memória central e efetora após o transplante.

Observou-se uma diminuição significativa do número de células $T_{CM} CD4^+$ durante todos os períodos pós-TACTH analisados, quando comparados com o período pré-transplante (**Figura B.4A**). Em ambos os grupos clínicos não foi observada uma recuperação dos níveis pré-transplante das células $T_{CM} CD4^+$, estando o número absoluto dessas subpopulações estatisticamente diminuído em praticamente todos os períodos pós-transplante avaliados (**Figura 4A**). Diferentemente das células $T_{CM} CD4^+$, o número de células $T_{CM} CD8^+$, aumentou significativamente nos períodos iniciais após o transplante (2 e 3 meses) e diminuiu aos 48, 60 e 66 meses do IAD/TACTH, comparado ao período pré-transplante (**Figura B.4B**). O grupo livre de insulina ≥ 3 anos teve uma maior expansão da subpopulação de células $T_{CM} CD8^+$, apresentando um aumento significativo dessas células nos períodos 30, 36 e 60 meses pós-TACTH, em relação ao grupo livre de insulina < 3 anos (**Figura 4B**).

Diferentemente da reconstituição das células $T_{CM} CD4^+$, ocorreu uma diminuição significativa do número absoluto de células $T_{EM} CD4^+$ apenas aos 54 e 60 meses pós-TACTH, (**Figura B.5A**). Ao observar-se a reconstituição das subpopulações de células T $CD4^+$ analisadas até agora, pode-se concluir que a reconstituição das células T $CD4^+$ ocorre de maneira tardia quando comparada à reconstituição das células T $CD8^+$, as quais sofrem intensa proliferação nos períodos iniciais pós-transplante. Diante dessa observação, buscou-se entender porque o número das células $T_{EM} CD4^+$ não diminuem nos períodos iniciais após o TACTH. Quando os pacientes são divididos segundo a resposta clínica, o grupo livre de insulina ≥ 3 anos não apresentou alterações no número absoluto dessa subpopulação em nenhum período pós-TACTH (**Figura 5A**). Já, o grupo livre de insulina < 3 anos, mostrou um aumento estatisticamente significativo dessa subpopulação nos meses iniciais (2 e 3 meses) pós-TACTH) e uma diminuição em períodos posteriores (24, 30, 42, 54 e 60 meses), quando comparados ao período pré-transplante. O número absoluto de células $T_{EM} CD4^+$ estava significativamente maior nos pacientes do grupo livre de insulina < 3 anos, em relação ao grupo livre de insulina ≥ 3 anos, nos períodos 2-9 meses pós-TACTH.

Após a IAD/TACTH foi observado um aumento estatisticamente significativo do número absoluto de células $T_{EM} CD8^+$ nos períodos 3-30, 42, 48, 66 e 72 meses pós-transplante, quando comparado aos valores pré-TACTH. (**Figura B.5B**). Ao analisar-se a reconstituição dessa subpopulação nos grupos clínicos, observou-se um aumento significativo dessas células no grupo livre de insulina < 3 anos nos meses 2, 3, 9, 18, 30 pós-transplante, enquanto o grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou um aumento das células $T_{EM} CD8^+$ somente aos 6 e 48 meses pós-TACTH (**Figura 5B**).

Figura 3. Reconstituição de linfócitos T *naïve* e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T *naïve* $CD4^{+}CD27^{+}CD45RO^{-}$ (A), linfócitos T *naïve* $CD8^{+}CD27^{+}CD45RO^{-}$ (B) e de linfócitos T recém-imigrados do timo $CD3^{+}CD4^{+}CD45RA^{+}CD31^{+}$ (C). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e ≥ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 4. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T de memória central $CD4^+CD27^+CD45RO^+$ (A) e $CD8^+CD27^+CD45RO^+$ (B). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e ≥ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 5. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/µL) de linfócitos T de memória efetora CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ (A) e CD8⁺CD27⁺CD45RO⁺ (B). Os dados estão representados como média ± DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e ≥ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.1.3. Reconstituição de células T supressoras

A frequência da população de células T CD8⁺ que não expressa CD28, foi quantificada. O número de células T CD8⁺CD28⁻ aumentou significativamente ($p < 0,05$) aos 2-18 e 30-42 meses após o transplante quando comparado ao período pré-transplante (**Figura B.6**). Vale ressaltar que esse aumento foi observado principalmente no grupo livre de insulina ≥ 3 anos, sendo estatisticamente significativo aos 6, 12 e 42 meses pós-TACTH quando comparado ao período pré-transplante (**Figura 6**). Observou-se aumento dessa subpopulação celular no grupo livre de insulina < 3 anos apenas aos 18 meses pós- transplante.

Figura 6. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/µL) de linfócitos T supressores CD8⁺CD28⁻. Os dados estão representados como média ± DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.1.4. Reconstituição de linfócitos T reguladores e expressão de FOXP3

As células T reguladoras (Tregs) constituem uma importante subpopulação de células T CD4⁺ na regulação do sistema imune e controle da autoimunidade (50). Elas possuem um papel importante no reestabelecimento da tolerância e na remissão duradoura da doença autoimune após o TACTH (228, 251, 295, 325), portanto avaliou-se a reconstituição dessas células CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺, bem como a expressão de FOXP3 nas células CD4⁺CD25^{hi} após o transplante, fator de transcrição das células Tregs CD4⁺CD25^{high} e responsável pela manutenção fenotípica e imunorreguladora das mesmas (326).

Não houve diferença após o transplante no número de células T CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ reconstituídas, em relação ao período pré-transplante, quando os pacientes foram analisados todos juntos, portanto, o IAD/TACTH não foi capaz de induzir a geração ou proliferação de células T reguladoras pós-transplante nos pacientes com DM1 (**Figura B.7**). No entanto, quando os pacientes são divididos em grupos de acordo com a resposta clínica, o grupo livre de insulina < 3 anos apresentou um maior número absoluto de Tregs do que o grupo livre de insulina ≥ 3 anos no período pré-transplante. Porém, após o transplante não foram observadas alterações no número dessas células no grupo livre de insulina < 3 anos, enquanto que o grupo livre de insulina ≥ 3 anos apresentou um aumento significativo dessas células aos 18, 30 e 60 meses pós-TACTH, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura 7A**).

Paralelamente, observou-se diminuição significativa da porcentagem de células $CD4^+CD25^{hi}$ expressando FOXP3 nos pacientes livres de insulina < 3 anos nos períodos 30 e 42 pós-TACTH, em relação ao período pré-transplante. Não houve alteração da porcentagem de células $CD4^+CD25^{hi}$ expressando FOXP3 nos pacientes livres de insulina ≥ 3 anos (**Figura 7, B**).

Figura 7. Reconstituição de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ em pacientes com DM1 divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ (A) e frequência (%) de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ expressando FOXP3 (B). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo < 3 anos). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo ≥ 3 anos). (#) $p < 0,05$ entre o grupo < 3 anos e ≥ 3 anos no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.2. Esclerose múltipla

5.2.2.1. Reconstituição de linfócitos T e B

O número de linfócitos totais diminuiu significativamente ($p<0,05$), em relação ao período pré-transplante, nos períodos 3-12 meses pós-transplante, sendo observada a normalização do número de linfócitos totais nos pacientes 18 meses após o TACTH (**Figura C.1A**). O grupo de pacientes respondedores apresentou maior quantidade de linfócitos totais no período pré-transplante se comparado ao grupo de pacientes não-respondedores. Quando comparados ao período pré-transplante, o grupo não-responder apresentou linfopenia (números de linfócitos totais diminuídos) somente 9 meses pós-transplante, enquanto que o grupo respondedor apresentou maiores períodos de linfopenia (6 e 12 meses pós-TACTH) (**Figura 8A**).

Houve diminuição estatisticamente significativa dos linfócitos T $CD3^+$ em todos os períodos avaliados após o IAD/TACTH, não sendo observada a recuperação dos valores basais de linfócitos T $CD3^+$ nos pacientes até 72 meses pós-transplante (**Figura C.1B**). Dois meses pós-IAD/TACTH o grupo respondedor apresentou maior número de células T $CD3^+$ do que o grupo não-responder. O grupo respondedor apresentou mais períodos com diminuição de células T $CD3^+$ (6-60 meses pós-TACTH) que o grupo não-responder (2-9, 30 e 48 meses de pós-TACTH), em relação ao período pré-transplante (**Figura 8B**).

Diferentemente dos pacientes com DM1, não foi observada diminuição dos valores absolutos de células B $CD19^+$ após o transplante. Ao contrário, foi observado um aumento significativo do número dessas células 18 e 24 meses pós-TACTH, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura B.1C**). O grupo respondedor apresentou aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) dos valores absolutos de células B $CD19^+$ aos 18 e 24 meses pós-TACTH, quando comparado ao período pré-transplante. O número de células B foi maior, quando comparado ao grupo não-responder, nos períodos pré-transplante e 24 meses pós-TACTH (**Figura 8C**).

Após o transplante, ocorreu diminuição acentuada ($p<0,05$) de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ em todos os seguimentos pós-TACTH e aumento marcante de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ pós-TACTH nos períodos iniciais após o transplante (2, 3, 18 e 24 meses pós-TACTH), quando comparado ao período pré-transplante (**Figura C.2A** e **Figura C.2B**). Não foi observada a recuperação dos valores basais de células T $CD3^+CD4^+$ durante todo o seguimento após o transplante (**Figura C.2A**). O grupo de pacientes respondedores apresentou diminuição de células T $CD3^+CD4^+$ durante todos os períodos avaliados, enquanto que o grupo não-

respondedor apresentou normalização do número dessas células nos períodos 24 e 60 meses pós-IAD/TACTH, quando comparados ao período pré-transplante (**Figura 9A**).

O número absoluto de células T $CD3^+CD8^+$ aumentou significativamente no grupo respondedor 2 meses pós-TACTH quando comparado ao período pré-transplante, sendo esses valores superiores aos do grupo não-respondedor no mesmo período (**Figura 9B**). O grupo não-respondedor apresentou aumento do número de células T $CD3^+CD8^+$ nos períodos 12-24 meses pós-transplante, quando comparado ao período pré-transplante.

A diminuição dos linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e o aumento de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ resultou na inversão da razão $CD3^+CD4^+:CD3^+CD8^+$ aos 48, 60 e 72 meses pós-transplante (**Figura C.2C**). Os grupos de pacientes respondedores e não-respondedores apresentaram inversão da razão $CD3^+CD4^+:CD3^+CD8^+$ até 60 e 48 meses pós-TACTH (**Figura 9C**), respectivamente.

Figura 8. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos totais (A), linfócitos T CD3^+ (B) e linfócitos B CD19^+ (C). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 9. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μ L) de linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺ (A) e linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ (B). (C) Razão dos valores absolutos de linfócitos T CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺. Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) p<0,05 entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) p<0,05 entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) p<0,05 entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.2.2. Reconstituição de células T *naïve*, de memória e células T recém-imigradas do timo

Observou-se lenta reconstituição de linfócitos T *naïve* CD4⁺ e CD8⁺ nos pacientes com EM após o TACTH. O número absoluto dessas células encontrou-se abaixo dos valores pré-transplante até 54 meses após TACTH (**Figura B.3A** e **Figura B.3B**). Em comparação com período pré-transplante, o grupo respondedor apresentou números de células T *naïve* CD4⁺ e CD8⁺ significativamente menores, até 48 meses e entre 2-6/12-42 meses pós-transplante, respectivamente (**Figura 10A** e **Figura 10B**). O grupo não-respondedor exibiu menos períodos com diminuição de células T *naïve* CD4⁺ e CD8⁺, apresentando valores estatisticamente menores do que o período pré-transplante nos 2-12/24/30 meses e 6-12/30 meses pós-TACTH, respectivamente.

A **Figura C.3C** mostra que o número absoluto de células T CD4⁺CD45RA⁺ que co-expressam o marcador CD31, diminuiu praticamente em todos os períodos avaliados após o TACTH ($p < 0,05$ nos meses 2-12 e 30-72 meses pós-transplante). A partir de 12 meses pós-transplante, o número dessas células apresentou uma tendência a aumentar, porém durante os 6 anos de seguimento pós-TACTH avaliados não foi observada uma efetiva normalização dos valores dessa subpopulação no sangue periférico. Ambos os grupos clínicos mostraram lenta reconstituição dessa subpopulação celular, estando esta estatisticamente diminuída nos períodos 2-12, 30 e 60 meses pós-TACTH no grupo não-respondedor e até 60 meses pós-TACTH no grupo respondedor, quando comparados ao período pré-TACTH. O grupo respondedor apresentou reconstituição mais tardia de células T CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ quando comparada ao grupo não-respondedor (**Figura 10C**).

Em ambos os grupos clínicos não foi observada uma efetiva reconstituição dos níveis basais das células T_{CM} CD4⁺. O número de células T_{CM} CD4⁺ estava diminuído durante todos os períodos pós-TACTH no grupo respondedor (**Figura 11A**). O grupo não-respondedor apresentou menos períodos com linfopenia de células T_{CM} CD4⁺ pós-TACTH ($p < 0,05$ nos períodos 2-12, 30, 36 e 48 meses pós-transplante).

Ao contrário das células T_{CM} CD4⁺, o número de células T_{CM} CD8⁺ aumentou significativamente nos períodos iniciais após transplante (2-6, 12 e 18 meses), quando comparado ao período pré-transplante (**Figura C.4B**). O grupo de pacientes respondedores apresentou maior expansão dessa subpopulação T_{CM} CD8⁺, exibindo valores estatisticamente maiores do que os do grupo de pacientes não-respondedores aos 2 meses pós-TACTH. Além disso, o grupo respondedor apresentou aumento significativo de células T_{CM} CD8⁺ nos períodos 2, 6 e 18 meses pós-TACTH, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura**

11B). Ocorreu aumento do número de células $T_{CM} CD8^+$ nos 2 e 6 meses pós-TACTH no grupo não-respondedor.

Diferentemente da reconstituição das células $T_{CM} CD4^+$, foi observado aumento significativo ($p<0,05$) do número de células $T_{EM} CD4^+$ 2 meses pós-TACTH, e diminuição dessa subpopulação 9 meses pós-TACTH, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura C.5A**). Ao observar-se a reconstituição das células $T_{EM} CD4^+$ nos grupos clínicos, o grupo respondedor apresentou valores maiores dessa subpopulação no período pré-transplante do que o grupo não-respondedor. Houve diminuição do número de células $T_{EM} CD4^+$ 9, 12 e 42 meses pós-transplante no grupo respondedor, em relação ao níveis basais (**Figura 12A**). O mesmo não ocorreu para o grupo não-respondedor, que apresentou aumento dessa subpopulação nos 24, 42 e 60 meses pós-TACTH. No período 42 meses pós-transplante, o grupo não-respondedor apresentou maior número de células $T_{EM} CD4^+$ do que o grupo respondedor.

Após-IAD/TACTH foi observado aumento significativo do número absoluto de células $T_{EM} CD8^+$ nos períodos 2 e 24 meses pós-transplante, quando comparado aos valores pré-TACTH. (**Figura C.5B**). Em relação período pré-transplante, observou-se aumento significativo de células $T_{EM} CD8^+$ no grupo não-respondedor 24 meses pós-transplante, enquanto o grupo respondedor apresentou aumento dessas células 2 meses pós-TACTH e diminuição aos 42 meses pós-transplante (**Figura 12B**). Aos 2 e 48 meses pós-IAD/TACTH o grupo respondedor apresentou maior quantidade de células $T_{EM} CD8^+$ do que o grupo não-respondedor.

Figura 10. Reconstituição de linfócitos T *naíve* e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T *naíve* $CD4^+CD27^+CD45RO^-$ (A), linfócitos T *naíve* $CD8^+CD27^+CD45RO^-$ (B) e de linfócitos T recém-imigrados do timo $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (C). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 11. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T de memória central $CD4^+CD27^+CD45RO^+$ (A) e $CD8^+CD27^+CD45RO^+$ (B). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura 12. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T de memória efetora $CD4^+CD27^+CD45RO^+$ (A) e $CD8^+CD27^+CD45RO^+$ (B). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.2.3. Reconstituição de células T supressoras

O número absoluto de células T $CD8^+CD28^-$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) aos 6 a 36 meses após o transplante, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura C.6**), principalmente no grupo de pacientes com EM respondedores ($p < 0,05$ nos períodos 6-18 e 30-36 meses) (**Figura 13**). Observou-se aumento dessa subpopulação celular no grupo não-respondedor aos 6 e 12-24 meses após o transplante. Além disso, no período 30 meses pós-transplante, o número absoluto de células T $CD8^+CD28^-$ do grupo respondedor estava significativamente aumentado em relação ao grupo não-respondedor.

Figura 13. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μ L) de linfócitos T supressores CD8⁺CD28⁻. Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

5.2.2.4. Reconstituição de linfócitos T reguladores e expressão de FOXP3

Diferentemente dos pacientes com DM1, houve diferença pós-TACTH na reconstituição das células T CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺, ocorrendo aumento estatisticamente significativo dessa subpopulação 12-36 meses pós-transplante (**Figura C.7**). Portanto, esses resultados indicam que a terapia de IAD/TACTH foi capaz de induzir a produção *de novo* ou proliferação homeostática de células Tregs nos pacientes com EM. Ao analisar-se os pacientes divididos em grupos clínicos, observou-se aumento do número dessas células no grupo respondedor de 12 a 36 meses pós-transplante, quando comparado ao período pré-transplante (**Figura 14A**). Houve aumento do número de células Tregs aos 12, 24 e 36 meses pós-transplante no grupo não-respondedor quando comparado ao período pré-transplante.

Paralelamente, houve aumento significativo da porcentagem de células CD4⁺CD25^{hi} expressando FOXP3 nos períodos 18 e 24 meses pós-TACTH, quando comparados ao período pré-transplante, nos grupos de pacientes respondedores e não-respondedores, respectivamente (**Figura 14B**). Além disso, o grupo respondedor apresentou maior porcentagem de células CD4⁺CD25^{hi} expressando FOXP3 do que o grupo não-respondedor no período 36 meses pós-TACTH.

Figura 14. Reconstituição de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ em pacientes com EM divididos de acordo com a resposta clínica, após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ (A) e frequência (%) de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ expressando FOXP3 (B). Os dados estão representados como média $\pm$ DP. (*) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Não-Respondedores). (b) $p < 0,05$ entre o período pré-transplante (pré) vs período (mês) pós-transplante assinalado (grupo Respondedores). (#) $p < 0,05$ entre o grupo Não-Respondedores e Respondedores no período (mês) assinalado. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Atualmente, a IAD/TACTH constitui uma alternativa terapêutica promissora para as DAIs, impedindo a progressão da doença e/ou favorecendo o uso da terapêutica convencional em pacientes anteriormente refratários (204, 206, 209, 217, 224, 225, 231-233, 235, 239, 316). No entanto, estudos quantitativos e funcionais detalhados do novo sistema imunológico reconstituído pelas células-tronco hematopoéticas autólogas após o transplante, são ainda necessários para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos de ação da IAD/TACTH no tratamento de DAIs, o que é essencial para melhoria dos protocolos clínicos e maior aplicação desta terapia no tratamento dessas doenças (204, 272). Neste contexto, esse estudo avaliou a reconstituição imunológica das subpopulações de células T e B periféricas após a terapia de IAD/TACTH em pacientes com DM1 e EM, com objetivo de entender os mecanismos de reconstituição imunológica nesses pacientes e possivelmente revelar biomarcadores de resposta terapêutica envolvidos nesse tratamento.

6.1. Resposta clínica dos pacientes com DM1 e EM após a terapia com IAD/TACTH

Em geral, os pacientes com DM1 e EM avaliados nesse trabalho apresentaram respostas clínicas satisfatórias após a terapia de IAD/TACTH, corroborando outros estudos da literatura (201, 209, 236, 242, 245, 249, 327, 328).

Os 21 pacientes com DM1 submetidos a terapia de IAD/TACTH alcançaram a independência insulínica por períodos variáveis de tempo, 18 transitoriamente e 3 continuamente após o transplante. Se divididos conforme a resposta terapêutica (período de tempo livre de insulina), 10 pacientes ficaram livre de insulina por período menor de 3 anos (47,6%) e 11 ficaram livres de insulina por um período maior ou igual a 3 anos (52,4%).

Embora a maioria dos pacientes com DM-1, que inicialmente ficaram livres de insulina, tenham retomado o uso da mesma após períodos de tempo variáveis pós-TACTH, a resposta terapêutica foi promissora, pois a maioria dos pacientes alcançou independência insulínica completa por períodos muito prolongados e apresentaram aumento dos níveis séricos de peptídeo-C (**Anexo B**). Nossos resultados clínicos foram recentemente corroborados por trabalhos de outros grupos transplantadores (202, 203, 246-248, 329). A dosagem do peptídeo-C sérico é uma das formas mais comuns de se avaliar a preservação das células β e produção de insulina por essas células em indivíduos diabéticos (329-331). Vários estudos vêm demonstrando que altos níveis de peptídeo-C previnem complicações crônicas do diabetes a longo prazo (331-333).

Dentre os 37 pacientes com EM submetidos a terapia de IAD/TACTH e avaliados em nosso estudo, 22 responderam ao tratamento (59,46%), apresentando diminuição ou estabilização dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente melhora das funções motoras e da qualidade de vida. Os outros 15 pacientes (40,54%) não responderam ao tratamento, apresentando aumento dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente progressão da doença. Esses resultados corroboram outros estudos clínicos mundiais (201, 209, 236, 242, 245, 327, 328).

A ausência de lesões de atividade ou de novas lesões após o TACTH indica uma intensa ação anti-inflamatória e imunossupressora do TACTH nos pacientes com EM, consistente com outros estudos (201, 209, 236, 242, 245, 327, 328). Por outro lado, houve a permanência de lesões desmielinizantes sequelares antigas já encontradas nos pacientes antes do transplante. A progressão neurológica, com consequente aumento do EDSS, observada em 15 pacientes com EM transplantados foi provavelmente consequência de processos degenerativos axonais que podem ocorrer em estágios avançados da doença (mesmo na ausência de inflamação), agravados por complicações do transplante, ou resultantes da perda inevitável de tecido cerebral pela EM, com consequente atrofia do cérebro (334-337).

6.2. Reconstituição imunológica

Apesar do rápido acúmulo de experiência clínica durante os 17 anos em que a terapia de IAD/TACTH vem sendo usada no tratamento de DAIs, dados sobre os mecanismos de ação envolvidos nessa terapia não existiam até 2004, quando os primeiros estudos de reconstituição imunológica começaram a surgir na literatura (201, 222, 228, 234, 247, 248, 251, 257, 259, 260, 262, 325, 338-343).

Em resumo, esses trabalhos avaliaram a reconstituição imunológica em pacientes com diferentes DAIs e revelaram alguns mecanismos imunológicos de ação do TACTH. Atualmente sugere-se que o mecanismo de ação do TACTH seja baseado na reprogramação do sistema imunológico ou "*immuno resetting*", caracterizada pela renovação do repertório de células T e B e também pela restauração das vias de imunorregulação nos pacientes (204, 217, 229, 235, 250, 344). Nesse contexto, nosso estudo vem acrescentar dados inéditos e importantes sobre os mecanismos de reconstituição imunológica em pacientes com EM e DM1 após a IAD/TACTH. Vale ressaltar que nosso estudo é o primeiro a avaliar a reconstituição imunológica por um período de seis anos após o transplante.

6.2.1. Reconstituição de linfócitos T e B

O TACTH foi capaz de gerar linfopenia em ambos os grupos de pacientes, ocorrendo a recuperação dos valores basais de linfócitos totais aos 30 e 18 meses pós-transplante, nos pacientes com DM1 e EM respectivamente. No entanto, os números de células T CD3⁺ não atingiram os valores basais durante todo o seguimento avaliado. Os grupos de melhor resposta clínica (pacientes com DM1 livres de insulina ≥ 3 anos e pacientes com EM respondedores) foram aqueles que apresentaram maiores períodos de linfopenia (linfócitos totais e de células T CD3⁺) após a IAD/TACTH.

Atualmente, sabe-se que o efeito imunossupressor intenso é o principal mecanismo do TACTH em DAIs, nos primeiros 1-2 anos pós-transplante (217), sendo a linfopenia considerada um mecanismo de ação inespecífico do IAD/TACTH, pois leva à diminuição de todas as subpopulações de linfócitos, sendo estas autorreativas ou não (204, 231, 251, 257, 345). Diversos pesquisadores acreditam a linfopenia persistente após o transplante é fundamental para a ação terapêutica do TACTH e associa-se a remissões clínicas prolongadas (206, 234, 251, 257, 345). Porém, Muraro e colaboradores mostraram em pacientes com EM que o mecanismo de ação do TACTH não é dependente de linfopenia prolongada, e sim de mudanças qualitativas e quantitativas profundas no repertório de células T após o transplante (201). Nossos dados mostram resultados inéditos, confirmando que as remissões clínicas prolongadas em pacientes com DM1 e EM tratados com IAD/TACTH foram dependentes de linfopenia persistente (menores números de linfócitos totais e de células T CD3⁺).

Ao contrário dos linfócitos T CD3⁺, os linfócitos B CD19⁺ reconstituem-se precocemente após TACTH. Diversos estudos mostraram que as células B se encontram diminuídas ou indetectáveis durante os 2 primeiros meses pós-transplante, reconstituindo após esse período pela formação de novas células B *naïve* pela medula óssea e/ou proliferação das células residuais ou que foram reinfundidas juntamente com as CTHs no transplante (201, 222, 234, 247, 259, 262, 312, 346). Além disso, a frequência dessas células tende a aumentar pós-transplante em relação aos níveis basais, conforme observado em nossos pacientes com EM aos 18 e 24 meses após o TACTH, mas não nos pacientes com DM1.

Embora o números de linfócitos B comece a normalizar, em geral, a partir de três meses pós-TACTH, a função das células B pode levar até mais de dois anos para normalizar completamente. Deficiências na resposta humoral de pacientes após o TACTH são atribuídas à falta ou diminuição do estímulo por células T CD4⁺, uma vez que o número de células T CD4⁺ diminui drasticamente nos primeiros anos pós-transplante, como discutiremos a seguir. Os níveis séricos de imunoglobulinas permanecem baixos durante os três primeiros meses

após o transplante, durante o mesmo período no qual o número de células B circulantes está reduzido (263, 264, 267).

Os pacientes com DM1 que ficaram livres de insulina ≥ 3 anos apresentaram números absolutos de células B CD19⁺ superiores aos dos pacientes livres de insulina < 3 anos em alguns períodos pós-TACTH, sendo que o mesmo ocorreu com o grupo de pacientes com EM respondedores. Farge e colaboradores mostraram uma correlação positiva entre os números de linfócitos CD19⁺ e CD20⁺ e a presença de altos níveis de autoanticorpos anti-Scl70, em pacientes com ES submetidos ao TACTH (234). Além disso, o grupo de pacientes que não responderam ao transplante ou tiveram recaída da doença apresentou números maiores de células B do que o grupo que apresentou resposta sustentada ao TACTH. Essa observação sugere que clones de células B patogênicas possam ter se expandido preferencialmente nos pacientes com esclerose sistêmica que não responderam ao TACTH (234). Porém, em outros estudos não houve correlação entre os níveis de autoanticorpos e/ou frequência de células B CD19⁺ e remissão clínica da doença (222, 247, 248, 260, 347).

Como em nosso trabalho os pacientes com melhor resposta clínica foram aqueles que apresentaram maiores números de linfócitos B CD19⁺, hipotetizamos que: (A) não ocorreu expansão preferencial de clones de células B autorreativas após o transplante; (B) a autorreatividade de células B contribui pouco na patogênese do DM1 e EM, classicamente associadas com células T autorreativas; ou (C) as células B expandidas pós-transplante possuíam funções reguladoras, como recentemente descrito (348).

Apesar de sugerirmos que não houve expansão pós-transplante de células B autorreativas em nossos pacientes com DM1, a observação de que os níveis de anticorpos anti-GAD65 diminuíram, porém não desapareceram na maioria dos pacientes com DM1 após o transplante, sugere que o regime de condicionamento usado não foi capaz de eliminar completamente células B de memória autorreativas, ou que algumas delas foram reinfundidas novamente com as CTHs no momento do transplante. Assim, em nosso estudo, a resposta imune humoral não correlacionou-se com resposta clínica observada nos pacientes, em concordância com outros estudos realizados em pacientes com DM1 (246-248, 329).

Foi observada uma expansão preferencial de células T CD8⁺ durante a reconstituição do sistema imune pós-TACTH, levando à inversão da razão CD4/CD8 nos pacientes após o transplante. Essa PH deve-se a maior disponibilidade de MHC-I (presente em todas células nucleadas) que fornece sinais mitogênicos em ambientes linfopênicos, juntamente com IL-7, para as células T *naïve* e de memória residuais ou reinfundidas se multiplicarem, facilitando a reconstituição das células T CD8⁺ após o TACTH (20, 27, 283).

A reconstituição das células T CD4⁺ após o transplante é dificultada pela expressão restrita do MHC-II às APCs e células B (20, 277). Além disso, há maior disponibilidade de IL-7 em ambientes linfopênicos, o que leva a uma diminuição na expressão de MHC-II nas APCs, comprometendo ainda mais a reconstituição de células T CD4⁺ (20, 27, 274). Essa maior disponibilidade de IL-7 e consequente diminuição de MHC-II, é considerado um mecanismo imunológico para prevenção da ativação de células T CD4⁺ autorreativas em ambientes linfopênicos (20).

Células originadas por PH adquirem fenótipo e funcionalidades de células de memória, fazendo com que *pool* de células de memória, principalmente as T CD8⁺, se expanda após o TACTH (289, 349, 350). Uma vez que essas células T sofrem divisão de forma gradual e adquirem o fenótipo e capacidade funcional de células memória de forma irreversível, tem sido sugerido o termo proliferação induzida por linfopenia (*lymphopenia-induced proliferation* - LIP), considerado atualmente mais adequado do que proliferação homeostática (351). A reconstituição e LIP das células de memória será discutido adiante.

O mecanismos de proliferação homeostática não foi capaz de restabelecer a população de linfócitos T CD4⁺ nos pacientes com DM1 e EM, durante o período pós-TACTH analisado. Em contraste, a recuperação do número basal de linfócitos T CD8⁺ foi rapidamente alcançada, provavelmente pela PHa de células T CD8⁺ de memória como será discutido adiante. Houve um aumento significativo dessas células nos três primeiros meses após o TACTH nos nossos pacientes com DM1 e EM, corroborando outros estudos de reconstituição imunológica em pacientes com DAIs nos quais os pacientes foram acompanhados entre um e dois anos após o a IAD/TACTH (222, 234, 247, 259, 260, 262, 312, 347).

Recentemente um grupo chinês publicou um estudo sobre a reconstituição imunológica em nove pacientes com DM1 submetidos à IAD/TACTH e acompanhados por um ano pós-transplante, visando o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta terapêutica (247). Os pacientes foram divididos em dois grupos: livres de insulina (IF, N=6) e insulino-dependentes (ID, N=3), de acordo com a dependência insulínica pós-transplante. Ao avaliar a reconstituição imunológica no sexto mês pós-TACTH, foi observado que ambos os grupos mostraram números diminuídos de células T CD3⁺CD4⁺, porém foi observada a normalização dos números de células CD19⁺, células CD20⁺ e células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) nos mesmos. O número de linfócitos T totais (CD3⁺) estava diminuído somente no grupo IF, mas não no grupo ID, quando comparados ao período pré-TACTH de cada grupo respectivo. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos para as subpopulações linfocitárias analisadas, antes ou após o TACTH.

Nós mostramos que a eficácia terapêutica observada nos pacientes com DM1 (grupo livre de insulina ≥ 3 anos) após a IAD/TACTH dependeu, além de outros fatores, de uma linfopenia persistente, ao contrário dos resultados de Zhang e colaboradores (247). Vale ressaltar que esse trabalho avaliou um pequeno número de pacientes por um curto período de seguimento pós-transplante.

Outro trabalho avaliou superficialmente a reconstituição imunológica em 13 pacientes com DM1 após tratamento com IAD/TACTH, que foram acompanhados clínico e laboratorialmente por 3 anos. O número absoluto de células T totais $CD3^+$ estava diminuído até 1 ano pós-transplante. Durante os 3 anos de seguimento não se observou a recuperação do número basal de células T $CD3^+CD4^+$. O número absoluto de células T $CD3^+CD8^+$ encontrou-se diminuído até 6 meses pós-transplante. O mesmo foi observado para células NK $CD16^+CD56^+$ e células B $CD19^+$ (248). Os resultados mostrados por (248) corroboram nossos dados de reconstituição linfocitária pós-TACTH.

6.2.2. Reconstituição de células T *naïve*, de memória e células T recém-imigradas do timo

A reconstituição das células T $CD3^+$ depende de dois mecanismos distintos: produção de novas células T pelo timo (352) ou proliferação de células T residuais resistentes à imunoablação ou que foram reinfundidas juntamente com as CTHs no momento do transplante (353). A contribuição relativa de cada mecanismo na reconstituição do sistema imunológico varia com a idade, função tímica, disponibilidade de citocinas homeostáticas, estimulação antigênica e tempo de linfopenia. Além disso, o equilíbrio entre essas duas fontes de células T durante a reconstituição imunológica pode influenciar a resposta clínica ao transplante. Embora o mecanismo de expansão homeostática periférica consiga restaurar o número total de células T após a IAD/TACTH, o timo é a fonte exclusiva de novas especificidades de célula T e responsável pela renovação do repertório de células T após o transplante (354, 355).

O *pool* de células T $TCR\alpha\beta^+$ maduras nos órgãos linfóides secundários é formado através da lenta geração de novas células T *naïve* pelo timo (25, 274). A exportação tímica de novas células é maior no início da vida, mas continua até o final dela, diminuindo com o aumento da idade. Essas células passam pelos mecanismos de tolerância central e egressam do timo com uma fraca afinidade do TCR para antígenos próprios. As mesmas têm que se manter viáveis na periferia, em estado de intérfase durante meses, até o contato com o antígeno para o qual são específicas (27, 277, 356). Apesar da constante produção tímica *de*

*nov*o de células T *naïve*, o *pool* de células T na periferia permanece relativamente constante, sugerindo a existência de um equilíbrio homeostático que preserva não apenas a quantidade de células, mas também a diversidade e capacidade funcional das células T *naïve*, num espaço físico limitado (274).

Embora o objetivo fisiológico da seleção positiva tenha sido alvo de muitos debates, entende-se agora que a seleção de células T com uma fraca, mas significativa, reatividade a peptídeos próprios permite com que as células se interajam continuamente na periferia, via TCR, com esses peptídeos contra os quais elas têm certa reatividade (25, 277, 357, 358). Essa interação de baixa avidéz, aliada à presença de IL-7, promovem viabilidade celular por estímulos submitogênicos de sobrevivência (25, 275).

Em condições de linfopenia, como após irradiação, uso de medicação citotóxica ou pós-IAD/TACTH, devido à relativa abundância de IL-7, maior disponibilidade de “espaço” e de MHCs apresentando peptídeos próprios, observa-se uma proliferação compensatória das células T *naïve* e de memória (20, 25), denominada de PH ou LIP, conforme discutido anteriormente. Essa proliferação compensatória pode ser rápida ou lenta, de acordo da avidéz do reconhecimento e disponibilidade de citocinas (273). Esses mecanismos proliferativos são timo-independentes e promovem a expansão de células residuais não-depletadas pela IAD ou a expansão de células reinfundidas no momento do transplante, constituindo a primeira fase da reconstituição imunológica (27, 263, 267).

A proliferação homeostática periférica é responsável pela rápida restauração das células T, principalmente em pacientes mais velhos, devido à produção tímica limitada de células T *naïve* (359). No entanto, a proliferação homeostática é insuficiente para restabelecer a população de linfócitos T CD4⁺, sendo a sua reconstituição demorada e muito mais dependente da produção tímica do que as células T CD8⁺ (360, 361). Em contraste, a recuperação do número de células T CD8⁺ pode ser rapidamente alcançada pela expansão periférica de células T CD8⁺ maduras (274, 360, 362).

Por outro lado, os mecanismos dependentes do timo necessitam de produção *de novo* de células T *naïve* a partir de células precursoras derivadas das CTHs, gerando uma reconstituição de células T mais duradoura e diversificada, observada em períodos posteriores pós-IAD/TACTH (363). Após IAD é observada reativação tímica entre 2-3 anos pós-transplante, principalmente em crianças, com o aumento do volume do timo, acompanhado pela maior exportação de células T *naïve*, aumento dos níveis de TREC e maior diversidade do TCR (251, 364). A contribuição tímica para a reconstituição do *pool* de células T varia de

acordo com idade do indivíduo. Portanto, os mecanismos de reconstituição timo-independente das células T aumentam com a idade (361).

Em nosso trabalho, para avaliar a contribuição do timo na reconstituição imunológica pós-TACTH foi avaliada a reconstituição periférico das células T *naïve* CD27⁺CD45RO⁻ e RITs CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺. Foram usados marcadores fenotípicos que permitem distinguir vários estágios de diferenciação funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esses estágios incluem linfócitos T *naïve* CD27⁺CD45RO⁻, linfócitos T de memória central CD27⁺CD45RO⁺ e linfócitos T de memória efetora CD27⁻CD45RO⁺. As células T *naïve* CD4⁺ ou CD8⁺ (CD27⁺CD45RO⁻) são também CD45RA⁺CCR7⁺CD62L^{hi} (323, 365).

Dados indicam que reativação tímica pós-IAD/TACTH é o principal mecanismo para a formação de um novo sistema imune, diverso, funcional e autotolerante (201, 251);(9). No entanto, em nosso trabalho, pelo método utilizado, não observamos reativação tímica nos pacientes com DM1 e EM durante o seguimento pós-TACTH avaliado. Nos pacientes com DM1, os números de células T *naïve* CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻ e CD8⁺ CD27⁺CD45RO⁻ atingiram valores basais somente aos 42 e 60 meses após-TACTH, respectivamente. Nos pacientes com EM, a normalização foi ainda mais tardia, aos 60 meses após TACTH para ambas as subpopulações. Para ambas as doenças, não se observou a normalização do números de células RIT CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ durante os períodos avaliados.

Em nosso trabalho, a reconstituição mais lenta das subpopulações de células T *naïve* e nos pacientes com EM, comparado aos pacientes com DM1, pode ser justificada pela timoposee possivelmente mais limitada nesses pacientes por serem mais velhos. Em relação aos pacientes com DM1, recentemente foi descrito que o DM1 prejudica a mobilização de CTHs por alterar a função neural perivascular e a distribuição de CXCL12 na medula óssea (366, 367). Se essa "mobilopatia" poderia alterar a reconstituição imunológica a partir das CTHs após tratamento com IAD/TACTH ainda tem que ser estudado.

A produção tímica *de novo* de células T *naïve* contribui decisivamente para a reconstituição a longo prazo das células T CD4⁺. Assim, quando não há reativação tímica, a reconstituição de células T CD4⁺ torna-se prejudicada. Hakim e colaboradores (368) mostraram que em pacientes que não apresentaram reativação tímica após IAD, o número de células T CD4⁺ permaneceu diminuído significativamente mesmo 4 a 5 anos após o TACTH. A incapacidade de reconstituir completamente o *pool* de células T *naïve* após IAD foi previamente relatada e atribuída à propensão excessiva das células T *naïve* de sofrer apoptose (369).

Porém, nossos dados divergem de trabalhos que mostraram a reativação tímica e consequente renovação do repertório de células T em pacientes com EM após a ID/TACTH (201, 260). Darlington e colaboradores avaliaram quatorze pacientes com EM que foram submetidos à IAD/TACTH e acompanhados até dois anos pós-transplante (260). Durante o período avaliado não foi observada recuperação dos níveis basais de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ *naïve*. Porém, foi observada a normalização do número de células RIT a partir de 1 ano após-TACTH. Em nosso estudo, foi observada nos pacientes com EM normalização dos números absolutos de células RIT a partir de 18 meses após o transplante, manutenção dos níveis até 24 meses, e diminuição dos números dessas células a partir de 30 meses pós-TACTH, indicando uma diminuição da produção de novas células pelo timo. Nossos resultados corroboram o trabalho de Darlington e colaboradores, porém é impossível a comparação em períodos pós-TACTH mais tardios devido ao curto período de seguimento realizado nesse trabalho.

Vários estudos utilizam a quantificação de células RIT $CD4^+CD45RO^+CD31^+$ como uma avaliação indireta da produção tímica após o transplante (201, 355, 370). Porém, a expressão de CD31 não pode ser considerada um marcador definitivo de células recém-imigradas do timo, devido à variação da expressão de CD31 após a LIP (371). Com isso, o método mais indicado para a avaliação de células recém-produzidas pelo timo é a quantificação de TRECs (324, 372-374). Os TRECs são moléculas circulares de DNA, formadas e excisadas durante a recombinação V(D)J do receptor das células T. São estáveis dentro das células, não se replicam e são diluídos com a divisão celular, portanto são ótimos marcadores de células T *naïve* recém-imigrantes do timo (375, 376).

Resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que os níveis de TRECs nos pacientes com DM1 aumentaram a partir de 18 meses pós-TACTH (dados não mostrados), indicando que houve reativação tímica nesses pacientes, a qual não foi observada pela análises imunofenotípica realizada nesse estudo. Os níveis de TRECs nos pacientes com EM não aumentaram após o TACTH (dados não mostrados), corroborando nossos resultados de imunofenotipagem mas não os dados da literatura (201, 260).

Em nosso trabalho, houve uma predominância de células T de memória central ($CD27^+CD45RO^+$) e efetora ($CD27^-CD45RO^+$), principalmente $CD8^+$, após o TACTH. Essa predominância de células T de memória deveu-se provavelmente à expansão homeostática periférica de linfócitos T de memória residuais que sobreviveram ao regime de condicionamento ou foram reinfundidos com as CTHs no momento do transplante, ou à aquisição de fenótipo de memória pelas células T *naïve* após LIP, conforme discutido

anteriormente. Nossos resultados corroboram outros estudos de reconstituição imunológica em pacientes com DAIs após IAD/TACTH que também demonstraram uma expansão de células T de memória, principalmente CD8⁺, nos primeiros meses pós-transplante (222, 234, 247, 259, 260, 262, 312, 347). No entanto, nesses estudos foram acompanhados por no máximo um ano após o transplante.

As células T CD4⁺ ou CD8⁺ de memória central (CD27⁺CD45RO⁺) apresentam também o fenótipo CD45RA⁻CCR7⁺CD62L^{hi} (T_{CM}). As T_{CM} são células T primadas que migram para órgãos linfóides secundários e constituem um *pool* celular com alta capacidade de renovação (secretam principalmente IL-2 de forma autóloga) e baixa capacidade funcional. Após estímulo secundário, elas são capazes de se diferenciar em células T de memória efetora CCR7⁻ (323, 365, 377, 378).

As células T de memória efetora (CD27⁻CD45RO⁺) são também CD45RA⁻CCR7⁻CD62L^{lo} (T_{EM}). As T_{EM} apresentam receptores para migração para tecidos inflamados, portanto entram tecidos periféricos e podem conter rapidamente a inflamação ou infecção. Elas constituem uma população de células T primadas com função efetora imediata, produzem citocinas rapidamente, principalmente IL-2 e IFN- γ , e as células T_{EM} CD8⁺ têm elevados níveis de perforina (323, 365, 377, 378).

Ao analisar a reconstituição dos linfócitos T de memória central nos pacientes com DM1, observamos que o grupo de pacientes livres de insulina ≥ 3 anos apresentou maiores números de T_{CM} CD8⁺ aos 30, 36 e 60 meses pós-TACTH, em comparação com o grupo de pacientes livres de insulina < 3 anos. O mesmo ocorreu com o grupo de pacientes com EM respondedores, que exibiram maiores números dessas células aos 2 meses pós-transplante quando comparado ao grupo não-respondedor.

Diversos trabalhos mostraram que a LIP tardia induzida por linfopenia crônica é dirigida principalmente contra antígenos estranhos ou por excesso de citocinas (25, 379-382).. É convencionalmente chamado de proliferação crônica induzida por linfopenia (“*Chronic lymphopenia-induced proliferation*” - cLIP) e ocorre principalmente em resposta à antígenos da flora comensal (25, 379, 380). A LIP induzida por antígenos estranhos promove alta taxa de proliferação celular, fazendo com que as células geradas adquiram fenótipo e características funcionais de células efetoras. A proliferação induzida por excesso de citocinas ocorre quando, além da IL-7, se têm concentrações elevadas de IL-2 e IL-15, podendo induzir proliferação homeostática, mesmo em ambiente não-linfopênicos, sendo chamada de proliferação induzida por citocinas (“*cytokine-induced proliferation*” - CIP) (25). Essa proliferação é muito mais intensa e rápida do que a LIP citada acima, pois as células, além de

receberem estímulos via IL-2 e IL-15, continuam recebendo estimulação pela IL-7 e reconhecimento TCR-pMCH próprio (381, 382).

Como em nosso estudo não avaliamos as especificidades dessas subpopulações celulares, não podemos afirmar que esse aumento do número de células T CD8⁺ de memória central em períodos tardios após o TACTH tenha sido dirigido por cLIP.

A LIP em ambientes de linfopenia aguda, como nos períodos iniciais pós-IAD/TACTH, pode ser dividida em homeostática e espontânea, sendo classificada de acordo com velocidade proliferativa e citocinas envolvidas (383). A rápida proliferação celular durante a LIP, como observado para as células T_{EM} CD4⁺, é chamado de “espontânea” (284, 285), sendo observada alta taxa de crescimento celular de forma independente de IL-7 e com formação de células efetoras funcionais (273). Diferentemente da LIP espontânea, a LIP homeostática ocorre numa taxa de proliferação celular lenta e de forma dependente de IL-7, gerando células sem aquisição de funcionalidade efetora.

A LIP espontânea está associada ao forte reconhecimento de autoantígenos pelas células T, apresentando um importante papel no desenvolvimento de autoimunidade em ambientes linfopênicos (273, 285, 383, 384). A força da sinalização do TCR determina a propensão das células T à LIP. Assim, as células T que possuem o TCR com alta afinidade para peptídeos próprios sofrem taxas mais rápidas de LIP do que as células com baixa afinidade aos mesmos (23, 385). Vale ressaltar que essas células T_{EM} CD4⁺ expandidas após LIP espontânea possuem capacidade funcional normal, com produção de citocinas e capacidade de migração para tecidos periféricos, podendo portando, causar lesão a tecidos próprios (284, 383, 386-388).

As subpopulações de células T CD4⁺ apresentaram uma reconstituição deficiente em todos os períodos pós-TACTH avaliados, conforme citado e discutido anteriormente. A única subpopulação de células T CD4⁺ que não apresentou diminuição nos pacientes com DM1 pós-IAD/TACTH foram as células T_{EM}. Além disso, observou-se maiores valores de células T_{EM} CD4⁺ no grupo livre de insulina < 3 anos do que no grupo livre de insulina ≥ 3 anos de 2-9 meses pós-transplante. Portanto, o aumento observado na proliferação de células T_{EM} CD4⁺ nos pacientes com DM1 que apresentaram pior resposta clínica (livres de insulina < 3 anos), ocorreu, muito provavelmente, pelo mecanismo de LIP espontânea. Desse modo, células T CD4⁺ de memória autorreativas residuais ou reinfundidas, ao encontrarem em contato com o autoantígeno para as quais são específicas durante o período de linfopenia aguda pós-IAD, podem proliferar-se e exercerem sua capacidade efetora, levando à recaída da doença.

Nosso estudo, portanto, foi o primeiro a correlacionar a reconstituição de células T_{EM} CD4⁺ com a resposta terapêutica ao IAD/TACTH em pacientes com DM1, mostrando que números aumentados dessa subpopulação celular estão diretamente associados a baixa responsividade ao transplante ou recaída precoce da doença de base, confirmando a nossa hipótese de que a eficácia terapêutica da IAD/TACTH depende da redução ou eliminação das células T de memória.

Não existem estudos publicados que avaliaram a reconstituição das subpopulações linfocitárias em pacientes com DAIs após longos períodos (5-6 anos) pós-IAD/TACTH, portanto não temos parâmetros para comparação e discussão de nossos resultados. Porém, existem diversos estudos que correlacionam a reconstituição de células T CD4⁺ com a resposta clínica ao transplante alogênico (302, 305, 308-311, 389). Todos esses estudos mostraram que, quanto mais precoce ocorre a reconstituição de células T CD4⁺, maior a incidência de recaída clínica após o transplante.

6.2.3. Reconstituição de células T supressoras

As células T supressoras CD8⁺CD28⁻ (ou CD8⁺CD57⁺) constituem uma subpopulação celular caracterizada por um estado de senescência replicativa, decorrente da divisão excessiva *in vivo* e consequente perda de TRECs (390). São células com capacidade de regulação, podendo suprimir a atividade de células T autorreativas (391). Possuem capacidade imunorreguladora contato dependente, devido à alta expressão de CTLA-4 (392), ou contato independente, por produzirem IL-10 (393), TGF-β (394) e mediadores solúveis ainda não identificados (395-398). Além disso, essas células são capazes de expandir após estimulação (349, 390).

Em nosso trabalho, observamos que o número de células T CD8⁺CD28⁻CD57⁺ aumentou acentuadamente após o transplante, tanto nos pacientes com DM1 como nos pacientes com EM. A predominância de células T CD8⁺ observada nos primeiros meses após o TACTH, em nosso e em vários outros estudos, pode ser em parte devida à expansão dessa subpopulação de células T supressoras CD8⁺CD57⁺CD28⁻ (201, 251, 360, 364, 399).

(201) mostraram que após o TACTH, células T CD8⁺ clonalmente expandidas têm um fenótipo atípico de células de memória-efetora, apresentando marcadores e características de células senescentes, terminalmente diferenciadas (CD28⁻CD57⁺CD95⁺). Zhang e colaboradores mostraram que a expansão das células T CD8⁺CD28⁻ pós-TACTH estava intimamente relacionada à responsividade ao transplante, sendo que os pacientes não responsivos foram aqueles que não tiveram expansão dessa subpopulação celular (339). Após

transplante renal, pacientes com menores taxas de rejeição aguda foram aqueles que apresentaram maior expansão de células T CD8⁺CD28⁻ durante tratamento com Alemtuzumab (399). Em todos esses trabalhos, o efeito terapêutico da expansão dessa subpopulação foi atribuído à competição por espaço com as células T autorreativas ou patogênicas, fenômeno denominado "atrição imunológica". A atrição imunológica limita a capacidade do indivíduo de armazenar um grande número de células T de diferentes especificidades (400). Alguns autores sugerem que grandes expansões oligoclonais de células T CD8⁺CD28⁻ possam limitar drasticamente o potencial de re-expansão de células T autorreativas residuais após o TACTH (201, 251, 339).

Nossos resultados revelaram que os pacientes com DM1 e EM que apresentaram melhor resposta clínica ao TACTH (grupo livres de insulina ≥ 3 anos para DM1 e grupo respondedor para EM) foram os que apresentaram maior número dessas células T CD8⁺CD28⁻ supressoras após o transplante. Esses dados sugerem que essa subpopulação celular esteja relacionada com remissão clínica duradoura pós-TACTH, possivelmente devido à sua capacidade supressora e/ou pelo fenômeno de atrição imunológica que diminui o “espaço” para a proliferação de células autorreativas patogênicas.

6.2.4. Reconstituição de linfócitos T reguladores

As células Tregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ são geradas pelo timo (326, 401), sendo chamadas de Tregs naturais (nTregs) ou induzidas por TGF- β na periferia, sendo chamadas de Tregs induzidas (iTregs) (402, 403).

Após IAD/TACTH observamos que os pacientes com DM1 não apresentaram diminuição ou aumento dessa subpopulação, enquanto que os pacientes com EM mostraram um aumento de Tregs circulantes após o transplante. Quando divididos de acordo com a resposta clínica, somente os pacientes com DM1 livres de insulina ≥ 3 anos apresentaram aumento do número de Tregs após o TACTH, em relação ao período pré-transplante. Essas células Tregs, expandidas após o TACTH, podem ter sido: (A) produzidas *de novo* no período de reativação tímica após o transplante (228, 298, 404); (B) geradas na periferia, onde células T periféricas não-Treg podem adquirir a expressão de FOXP3 e se converter em células Tregs após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia (405-407); (C) coletadas no período de mobilização/aférese e reinfundidas juntamente com as CTHs no período do transplante propriamente dito (408); (D) expandidas no ambiente linfopênico pós-IAD/TACTH (409, 410); ou, ainda, (E) não depletadas pela IAD, por apresentarem maior resistência (409).

Winstead e colaboradores mostraram que as Tregs possuem a capacidade de inibir seletivamente a LIP espontânea (mas não a LIP homeostática), controlando o desenvolvimento de autoimunidade em ambientes de linfopenia aguda. Além disso, elucidaram que as Tregs inibem a LIP nos tecidos linfóides por mecanismos independentes de IL-10 e possuem capacidade de suprimir células autorreativas que tenham escapado para a periferia (384). Além disso, a presença de Tregs durante a LIP promove um repertório de células T mais diverso, autotolerante e funcional impedindo portanto, o desenvolvimento de autoimunidade durante a LIP (411).

Esses trabalhos corroboram nossos resultados, sugerindo que a expansão de Tregs apresentada somente pelo grupo de pacientes com DM1 livre de insulina ≥ 3 anos possa ter controlado a LIP espontânea de $T_{EM} CD4^+$ nos primeiros meses pós-transplante (observado somente no grupo livre de insulina < 3 anos, o qual não apresentou aumento do número de células Tregs). Em relação aos pacientes com EM, tanto o grupo respondedor quanto o não-respondedor apresentaram aumento do número de Tregs circulantes após o transplante, as quais podem ter impedido a LIP espontânea de células $T_{EM} CD4^+$ em ambos os grupos.

Embora as células T $CD4^+$ totais não tenham recuperado os valores basais durante todos os períodos avaliados após IAD/TACTH, nossos resultados sugerem uma expansão homeostática preferencial de células Tregs $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$, dentro da população de células T $CD4^+$ totais, durante a fase linfopênica da reconstituição imunológica.

Nossos resultados revelaram as células Tregs como um biomarcador de resposta terapêutica nos pacientes com DM1 submetidos a IAD/TACTH, uma vez que houve aumento do número absoluto dessas células somente no grupo livres de insulina ≥ 3 anos, em relação ao período pré-transplante. Esses resultados confirmam nossa hipótese e corroboram dados da literatura de que a expansão de células Tregs após o TACTH poderia controlar a autoimunidade nos pacientes, promover o restabelecimento da tolerância imunológica e consequentemente induzir uma remissão clínica prolongada da doença (228, 325, 339).

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Após a terapia de IAD/TACTH, todos os 21 pacientes avaliados alcançaram a independência insulínica por períodos variáveis de tempo, 18 transitoriamente (85,7%) e 3 (14,3%) continuamente após o transplante, apresentando um aumento significativo dos níveis de peptídeo-C (relacionado à massa de células β pancreáticas) após o transplante;
 - Após a terapia de IAD/TACTH, dentre os 37 pacientes com EM avaliados: 22 responderam ao tratamento (59,46%), apresentando diminuição ou estabilização dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente melhora das funções motoras e da qualidade de vida; 15 pacientes (40,54%) não responderam ao tratamento, apresentaram aumento dos valores de EDSS na última avaliação pós-transplante e consequente progressão da doença;
 - Em relação ao período pré-transplante, todos os grupos de pacientes com DM1 e EM apresentaram: 1, diminuição do número absoluto de células T $CD3^+$ praticamente em todos os períodos pós-transplante avaliados, indicando uma intensa linfopenia decorrente da IAD; 2, aumento acentuado do número de linfócitos T $CD8^+$ e a diminuição dos linfócitos T $CD4^+$, resultando na inversão da razão $CD4:CD8$ durante todo o seguimento pós-transplante avaliado; 3, aumento significativo no primeiro ano após o transplante das subpopulações de células T $CD8^+$ de memória central e memória efetora; 4, normalização dos números de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ *naïve* somente cinco anos após o transplante, enquanto o número de células T $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ recém-emigrantes do timo manteve-se abaixo dos valores pré-transplante durante todo o período avaliado, demonstrando que durante os seis anos de seguimento após a IAD/TACTH predominaram mecanismos timo-independentes de reconstituição imunológica; 5, normalização dos números de linfócitos B $CD19^+$ entre dois a três meses pós-transplante.
 - O grupo de pacientes com DM1 com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH ($DM1 \geq 3$ anos) apresentou, em relação ao período pré-transplante: número diminuído de células T $CD3^+$ (linfopenia) em vários períodos pós-transplante, número aumentado de células T $CD8^+CD28^-$ supressoras no primeiro ano pós-transplante principalmente, número diminuído de células T $CD4^+$ de memória efetora nos períodos 2 a 9 meses pós-transplante e número aumentado de células T $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ em alguns pós-transplante.
-

- O grupo de pacientes com EM com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (EM-R) apresentou, em relação ao período pré-transplante: número diminuído de células T CD3⁺ (linfopenia) em vários períodos pós-transplante e números aumentados de células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ e CD8⁺CD28⁻ supressoras nos primeiros três anos pós-transplante.
 - Em comparação com o grupo de pacientes com DM1 livres de insulina < 3 anos (N=10), o grupo de pacientes com DM1 com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (livres de insulina ≥ 3 anos, N=11) apresentou: número menor de células T CD4⁺ de memória efetora nos períodos 2 a 9 meses pós-transplante e número maior de células CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ recém-emigrantes do timo no período 60 meses pós-transplante;
 - Em comparação com o grupo de pacientes com EM não-respondedores (N=15), o grupo com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (respondedores, N=22) apresentou: números maiores de células CD8⁺CD28⁻ no período 30 meses pós-transplante, maior expressão de FOXP3 em células T CD4⁺CD25^{hi} no período 36 meses pós-transplante, números menores de células T CD4⁺ de memória central e efetora no período 42 meses pós-transplante, números maiores de células T CD8⁺ totais e células T CD8⁺ de memória central e efetora no período 2 meses pós-transplante;
 - Desse modo, esse estudo revelou que a resposta terapêutica dos pacientes com DM1 e EM ao TACTH depende de uma linfopenia persistente, do aumento de células T reguladoras e supressoras e diminuição de células T CD4⁺ de memória após o transplante.
-

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001;345(5):340-50.
 2. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 2001;7(8):899-905.
 3. Rioux JD, Abbas AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature*. 2005;435(7042):584-9.
 4. Mackay IR, Leskovsek NV, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun*. 2008;30(1-2):5-11.
 5. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6-7):A377-85.
 6. Ohashi PS. Negative selection and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(6):668-76.
 7. Mathis D, Benoist C. Levees of immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11(1):3-6.
 8. Peterson P, Org T, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):948-57.
 9. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):127-35.
 10. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*. 2001;344(9):655-64.
 11. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7042):590-7.
 12. Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010;11(8):666-73.
 13. von Boehmer H, Waldmann H. Immunological tolerance. *Front Immunol*. 2010;1:102.
 14. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11(1):21-7.
 15. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(1):11-9.
 16. Abbas AK, Lohr J, Knoechel B. Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *J Autoimmun*. 2007;28(2-3):59-61.
 17. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*. 1993;14(9):426-30.
 18. Avrameas S, Guilbert B, Mahana W, Matsiota P, Ternynck T. Recognition of self and non-self constituents by polyspecific autoreceptors. *Int Rev Immunol*. 1988;3(1-2):1-15.
 19. Grabar P. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol Today*; 1983. p. 337-40.
 20. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2088-94.
-

21. Tanchot C, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science*. 1997;276(5321):2057-62.
 22. Takeda S, Rodewald HR, Arakawa H, Bluethmann H, Shimizu T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity*. 1996;5(3):217-28.
 23. Kieper WC, Burghardt JT, Surh CD. A role for TCR affinity in regulating naïve T cell homeostasis. *J Immunol*. 2004;172(1):40-4.
 24. Moses CT, Thorstenson KM, Jameson SC, Khoruts A. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):1185-90.
 25. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naïve and memory T cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-62.
 26. Dorfman JR, Germain RN. MHC-dependent survival of naïve T cells? A complicated answer to a simple question. *Microbes Infect*. 2002;4(5):547-54.
 27. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):547-56.
 28. Almeida AR, Rocha B, Freitas AA, Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2005;17(3):239-49.
 29. Waldron-Lynch F, Herold KC. Advances in Type 1 diabetes therapeutics: immunomodulation and beta-cell salvage. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2009;38(2):303-17, viii.
 30. Nokoff N, Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281:1-15.
 31. Stanescu DE, Lord K, Lipman TH. The epidemiology of type 1 diabetes in children. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(4):679-94.
 32. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006;367(9513):847-58.
 33. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;328(23):1676-85.
 34. Rubin RR, Peyrot M. Quality of life and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 1999;15(3):205-18.
 35. Tao B, Pietropaolo M, Atkinson M, Schatz D, Taylor D. Estimating the cost of type 1 diabetes in the U.S.: a propensity score matching method. *PLoS One*. 2010;5(7):e11501.
 36. Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith G, Bloch C, et al. Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- to 17-year-old Colorado youth. *Diabetes Care*. 2007;30(3):503-9.
 37. Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. Diabetes Epidemiology Research International Group. *Diabetes*. 1990;39(7):858-64.
 38. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-33.
 39. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1247-52.
-

40. Weir GC, Nathan DM, Singer DE. Standards of care for diabetes. *Diabetes Care*. 1994;17(12):1514-22.
 41. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):625-40.
 42. Muller WA. Diabetes mellitus--long time survival. *J Insur Med*. 1998;30(1):17-27.
 43. Edge JA, Ford-Adams ME, Dunger DB. Causes of death in children with insulin dependent diabetes 1990-96. *Arch Dis Child*. 1999;81(4):318-23.
 44. Wibell L, Nyström L, Ostman J, Arnqvist H, Blohmé G, Lithner F, et al. Increased mortality in diabetes during the first 10 years of the disease. A population-based study (DISS) in Swedish adults 15-34 years old at diagnosis. *J Intern Med*. 2001;249(3):263-70.
 45. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
 46. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:69-89.
 47. Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EA, et al. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4037-43.
 48. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004;328(7442):750-4.
 49. Anjos S, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. *Mol Genet Metab*. 2004;81(3):187-95.
 50. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):849-59.
 51. Lammi N, Karvonen M, Tuomilehto J. Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? *Med Sci Monit*. 2005;11(3):RA63-9.
 52. Robles DT, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J Autoimmun*. 2001;16(3):355-62.
 53. Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet*. 1988;2(8601):1-4.
 54. Helgason T, Jonasson MR. Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet*. 1981;2(8249):716-20.
 55. Akerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 2002;115(1):18-29.
 56. Virtanen SM, Läärä E, Hyppönen E, Reijonen H, Räsänen L, Aro A, et al. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes*. 2000;49(6):912-7.
 57. Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hämäläinen AM, Muona P, Väättäinen M, et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(7):1389-94.
-

58. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 2003;290(13):1713-20.
 59. Thorsdottir I, Ramel A. Dietary intake of 10- to 16-year-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type 1 diabetes. *Ann Nutr Metab*. 2003;47(6):267-75.
 60. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Maclaren N, Jackson R, et al. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):103-8.
 61. Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, et al. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun*. 1999;12(4):279-87.
 62. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3896-902.
 63. Naquet P, Ellis J, Tibensky D, Kenshole A, Singh B, Hodges R, et al. T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J Immunol*. 1988;140(8):2569-78.
 64. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, et al. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1992;339(8791):458-9.
 65. Hawkes CJ, Schloot NC, Marks J, Willemen SJ, Drijfhout JW, Mayer EK, et al. T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(3):356-66.
 66. Brauner H, Elemans M, Lemos S, Broberger C, Holmberg D, Flodström-Tullberg M, et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2010;184(5):2272-80.
 67. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1999;189(2):347-58.
 68. Marleau AM, Summers KL, Singh B. Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2008;180(8):5235-49.
 69. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-85.
 70. Driver JP, Scheuplein F, Chen YG, Grier AE, Wilson SB, Serreze DV. Invariant natural killer T-cell control of type 1 diabetes: a dendritic cell genetic decision of a silver bullet or Russian roulette. *Diabetes*. 2010;59(2):423-32.
 71. Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest*. 1993;92(5):2313-22.
 72. Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med*. 2002;196(3):369-77.
-

73. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med*. 2003;198(10):1527-37.
 74. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, et al. Cocksackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5115-20.
 75. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001;414(6865):792-8.
 76. Arnush M, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB, Corbett JA. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol*. 1998;160(6):2684-91.
 77. Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*. 1998;160(7):3585-93.
 78. Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB, Beller DI. Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49(7):1106-15.
 79. von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):988-94.
 80. Poligone B, Weaver DJ, Sen P, Baldwin AS, Tisch R. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol*. 2002;168(1):188-96.
 81. Steptoe RJ, Ritchie JM, Harrison LC. Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2002;168(10):5032-41.
 82. Mandrup-Poulsen T. Beta cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1005:32-42.
 83. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997;7(6):727-38.
 84. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes*. 1994;43(5):613-21.
 85. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*. 2011;91(1):79-118.
 86. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. 1993;42(1):44-55.
 87. Ogawa M, Maruyama T, Hasegawa T, Kanaya T, Kobayashi F, Tochino Y, et al. The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in nonobese diabetic (NOD) mice *Biomed Res* 1985;6:103-5.
 88. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*. 1986;35(8):855-60.
-

-
89. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med*. 1987;166(4):823-32.
90. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003;46(3):305-21.
91. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997;186(4):613-8.
92. Kagi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997;186(7):989-97.
93. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219-26.
94. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133-41.
95. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-67.
96. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Memory CD4+CD127high T cells from patients with multiple sclerosis produce IL-17 in response to myelin antigens. *J Neuroimmunol*. 2010;226(1-2):185-91.
97. Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Canè S, Frizziero L, Facchini A. High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(5):522-7.
98. Röhn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, et al. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2006;36(11):2857-67.
99. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008;172(1):146-55.
100. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, et al. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med*. 2008;205(1):207-18.
101. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009;58(6):1302-11.
102. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol*. 2009;183(7):4432-9.
103. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, et al. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010;185(7):3814-8.
104. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010;185(3):1959-67.
-

105. Arif S, Moore F, Marks K, Bouckennooghe T, Dayan CM, Planas R, et al. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated β -cell death. *Diabetes*. 2011;60(8):2112-9.
106. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
107. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-40.
108. Shi B, Wang Z, Jin H, Chen YW, Wang Q, Qian Y. Immunoregulatory *Cordyceps sinensis* increases regulatory T cells to Th17 cell ratio and delays diabetes in NOD mice. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(5):582-6.
109. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun*. 2005;25 Suppl:56-62.
110. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(11):2903-13.
111. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):92-9.
112. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M, et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2008;154(3):353-9.
113. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 2010;59(2):407-15.
114. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2008;223:284-99.
115. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, Hamaguchi Y, Wang Y, Pop SM, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol*. 2008;180(5):2863-75.
116. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-86.
117. Elliott RB, Crossley JR, Berryman CC, James AG. Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes. *Lancet*. 1981;2(8247):631-2.
118. Harrison LC, Colman PG, Dean B, Baxter R, Martin FI. Increase in remission rate in newly diagnosed type I diabetic subjects treated with azathioprine. *Diabetes*. 1985;34(12):1306-8.
119. Cook JJ, Hudson I, Harrison LC, Dean B, Colman PG, Werther GA, et al. Double-blind controlled trial of azathioprine in children with newly diagnosed type I diabetes. *Diabetes*. 1989;38(6):779-83.
-

120. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;319(10):599-604.
 121. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes.* 1988;37(11):1574-82.
 122. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1692-8.
 123. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;352(25):2598-608.
 124. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* 2001;358(9295):1749-53.
 125. Saudek F, Havrdova T, Boucek P, Karasova L, Novota P, Skibova J. Polyclonal anti-T-cell therapy for type 1 diabetes mellitus of recent onset. *Rev Diabet Stud.* 2004;1(2):80-8.
 126. Roep BO, Solvason N, Gottlieb PA, Abreu JR, Harrison LC, Eisenbarth GS, et al. Plasmid-Encoded Proinsulin Preserves C-Peptide While Specifically Reducing Proinsulin-Specific CD8+ T Cells in Type 1 Diabetes. *Sci Transl Med.* 2013;5(191):191ra82.
 127. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247-69.
 128. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1180-8.
 129. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2004;113(6):788-94.
 130. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):393-407.
 131. Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. *J Autoimmun.* 2008;31(3):288-94.
 132. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007;6(10):903-12.
 133. Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(1):12-20.
 134. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002;359(9313):1221-31.
 135. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996;46(4):907-11.
 136. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005;58(6):840-6.
-

-
137. Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJ. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(7):507-14.
138. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):440-7.
139. Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(Pt 3):595-605.
140. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983;13(3):227-31.
141. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-7.
142. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
143. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):17-28.
144. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(4):291-301.
145. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.
146. Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*. 1991;38(1):1-15.
147. Laaksonen M, Pastinen T, Sjöroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti ML, et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis-a Finnish family study. *J Neuroimmunol*. 2002;122(1-2):140-5.
148. Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, Costa G, Pischedda MP, Pirastu M, et al. HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 *0201 and *0302 alleles. *Neurology*. 1992;42(4):883-6.
149. Brum DG, Barreira AA, dos Santos AC, Kaimen-Maciél DR, Matiello M, Costa RM, et al. HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(1):21-9.
150. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007;61(3):228-36.
151. Dean G, Yeo TW, Goris A, Taylor CJ, Goodman RS, Elian M, et al. HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology*. 2008;70(2):101-5.
152. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 2007;3(9):1607-13.
153. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007;39(9):1083-91.
-

154. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007;357(9):851-62.
155. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallström E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007;39(9):1108-13.
156. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand*. 1975;51(2):110-36.
157. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(4):382-427.
158. Ascherio A, Munch M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology*. 2000;11(2):220-4.
159. Pender MP, Greer JM. Immunology of multiple sclerosis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(4):285-92.
160. Martyn CN, Cruddas M, Compston DA. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(2):167-8.
161. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA*. 2003;289(12):1533-6.
162. Coo H, Aronson KJ. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2004;23(1-2):1-12.
163. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
164. Mikaeloff Y, Caridade G, Tardieu M, Suissa S, group Ks. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain*. 2007;130(Pt 10):2589-95.
165. Hernán MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 6):1461-5.
166. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*. 2004;3(12):709-18.
167. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*. 1933;58(1):39-53.
168. Ben-Nun A, Cohen IR. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J Immunol*. 1982;129(1):303-8.
169. Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol*. 1981;127(4):1420-3.
170. Irani D. Immunological mechanisms in multiple sclerosis. *Clin Appl Immunol Rev*. 2005;5(4):257-69.
171. Lassmann H. Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: what are the targets for therapy. *J Neurol Sci*. 2011;306(1-2):167-9.
-

172. Greenstein JI. Current concepts of the cellular and molecular pathophysiology of multiple sclerosis. *Dev Neurobiol.* 2007;67(9):1248-65.
173. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain.* 2002;125(Pt 3):538-50.
174. Peterson LK, Fujinami RS. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;184(1-2):37-44.
175. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol.* 2010;225(1):9-17.
176. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005;35(11):3343-52.
177. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, et al. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):178-84.
178. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971-9.
179. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(7):384-98.
180. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102(5):1045-50.
181. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med.* 1999;5(2):170-5.
182. Cooke A. Th17 cells in inflammatory conditions. *Rev Diabet Stud.* 2006;3(2):72-5.
183. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-45.
184. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(6):670-5.
185. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007;13(10):1173-5.
186. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999;5(2):101-4.
187. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002;8(5):500-8.
-

188. Hohlfeld R, Wekerle H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 Suppl 2:14599-606.
189. Virley DJ. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. *NeuroRx*. 2005;2(4):638-49.
190. Johnston J, So TY. First-line disease-modifying therapies in paediatric multiple sclerosis: a comprehensive overview. *Drugs*. 2012;72(9):1195-211.
191. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1124-40.
192. Comi G, Pulizzi A, Rovaris M, Abramsky O, Arbizu T, Boiko A, et al. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*. 2008;371(9630):2085-92.
193. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*. 2008;372(9648):1463-72.
194. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358(7):676-88.
195. Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet*. 1999;354(9191):1691-5.
196. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol*. 2006;253(1):98-108.
197. Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1786-801.
198. Bielekova B, Richert N, Howard T, Blevins G, Markovic-Plese S, McCartin J, et al. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8705-8.
199. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2003;348(1):15-23.
200. Burt RK, Cohen B, Rose J, Petersen F, Oyama Y, Stefoski D, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2005;62(6):860-4.
201. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med*. 2005;201(5):805-16.
202. Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2009;301(15):1573-9.
203. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007;297(14):1568-76.
-

204. Burt RK, Testori A, Testor A, Craig R, Cohen B, Suffit R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: what have we learned? *J Autoimmun.* 2008;30(3):116-20.
205. Burt RK, Balabanov R, Voltarelli J, Barreira A, Burman J. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis--if confused or hesitant, remember: 'treat with standard immune suppressive drugs and if no inflammation, no response'. *Mult Scler.* 2012;18(6):772-5.
206. Farge D, Labopin M, Tyndall A, Fassas A, Mancardi GL, Van Laar J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica.* 2010;95(2):284-92.
207. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev.* 2008;7(3):198-203.
208. Gratwohl A, Tyndall A. From autoimmunity to stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;30(2):159-72.
209. Snowden JA, Saccardi R, Allez M, Ardizzone S, Arnold R, Cervera R, et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(6):770-90.
210. Nelson JL, Torrez R, Louie FM, Choe OS, Storb R, Sullivan KM. Pre-existing autoimmune disease in patients with long-term survival after allogeneic bone marrow transplantation. *J Rheumatol Suppl.* 1997;48:23-9.
211. van Bakkum DW. Stem cell transplantation in experimental models of autoimmune disease. *J Clin Immunol.* 2000;20(1):10-6.
212. van Bakkum DW. Autologous stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. *Stem Cells.* 1999;17(3):172-8.
213. Ikehara S, Kawamura M, Takao F, Inaba M, Yasumizu R, Than S, et al. Organ-specific and systemic autoimmune diseases originate from defects in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(21):8341-4.
214. Van Bakkum DW. Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32 Suppl 1:S37-9.
215. Burt RK, Padilla J, Begolka WS, Canto MC, Miller SD. Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 1998;91(7):2609-16.
216. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550-61.
217. Sykes M, Nikolic B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature.* 2005;435(7042):620-7.
218. Voltarelli JC, Couri CE. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1(1):4.
219. Tyndall A, Black C, Finke J, Winkler J, Mertlesmann R, Peter HH, et al. Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation. *Lancet.* 1997;349(9047):254.
-

220. Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefoski D, Stefosky D, Balabanov R, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):244-53.
221. Burt RK, Traynor A, Statkute L, Barr WG, Rosa R, Schroeder J, et al. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *JAMA*. 2006;295(5):527-35.
222. Traynor AE, Schroeder J, Rosa RM, Cheng D, Stefka J, Mujais S, et al. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation: a phase I study. *Lancet*. 2000;356(9231):701-7.
223. van Laar JM, Farge D, Tyndall A. Stem cell transplantation: a treatment option for severe systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis*. 2008;67 Suppl 3:iii35-8.
224. Burt RK, Oliveira MC, Shah SJ, Moraes DA, Simoes B, Gheorghiade M, et al. Cardiac involvement and treatment-related mortality after non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation with unselected autologous peripheral blood for patients with systemic sclerosis: a retrospective analysis. *Lancet*. 2013;381(9872):1116-24.
225. Burt RK, Shah SJ, Dill K, Grant T, Gheorghiade M, Schroeder J, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet*. 2011;378(9790):498-506.
226. Burt RK, Milanetti F. Hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis: history and current status. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(6):519-29.
227. Couri CE, Voltarelli JC. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1(1):19.
228. de Kleer I, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood*. 2006;107(4):1696-702.
229. Hügler T, Daikeler T. Stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Haematologica*. 2010;95(2):185-8.
230. Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:9.
231. Burt RK, Slavin S, Burns WH, Marmont AM. Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? *Blood*. 2002;99(3):768-84.
232. Popat U, Krance R. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disorders: the American perspective. *Br J Haematol*. 2004;126(5):637-49.
233. Tyndall A, Saccardi R. Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(1):1-9.
234. Farge D, Henegar C, Carmagnat M, Daneshpouy M, Marjanovic Z, Rabian C, et al. Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1555-63.
-

235. Sullivan KM, Muraro P, Tyndall A. Hematopoietic cell transplantation for autoimmune disease: updates from Europe and the United States. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(1 Suppl):S48-56.
236. Saccardi R, Freedman MS, Sormani MP, Atkins H, Farge D, Griffith LM, et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous haematopoietic stem cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a position paper. *Mult Scler.* 2012;18(6):825-34.
237. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20(8):631-8.
238. Kozák T, Havrdová E, Pit'ha J, Gregora E, Pytlík R, Maaloufová J, et al. High-dose immunosuppressive therapy with PBPC support in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(5):525-31.
239. Tyndall A, Koike T. High-dose immunoablative therapy with hematopoietic stem cell support in the treatment of severe autoimmune disease: current status and future direction. *Intern Med.* 2002;41(8):608-12.
240. Tyndall A, Fassas A, Passweg J, Ruiz de Elvira C, Attal M, Brooks P, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplants for autoimmune disease--feasibility and transplant-related mortality. Autoimmune Disease and Lymphoma Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, the European League Against Rheumatism and the International Stem Cell Project for Autoimmune Disease. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(7):729-34.
241. Saccardi R, Kozak T, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, Kazis A, Havrdova E, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Mult Scler.* 2006;12(6):814-23.
242. Saccardi R, Mancardi GL, Solari A, Bosi A, Bruzzi P, Di Bartolomeo P, et al. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood.* 2005;105(6):2601-7.
243. Fassas A, Mancardi GL. Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it worthwhile? *Autoimmunity.* 2008;41(8):601-10.
244. Krasulová E, Trneny M, Kozák T, Vacková B, Pohlreich D, Kemlink D, et al. High-dose immunoablation with autologous haematopoietic stem cell transplantation in aggressive multiple sclerosis: a single centre 10-year experience. *Mult Scler.* 2010;16(6):685-93.
245. Fassas A, Kimiskidis VK, Sakellari I, Kapinas K, Anagnostopoulos A, Tsimourtou V, et al. Long-term results of stem cell transplantation for MS: a single-center experience. *Neurology.* 2011;76(12):1066-70.
246. Gu W, Hu J, Wang W, Li L, Tang W, Sun S, et al. Diabetic ketoacidosis at diagnosis influences complete remission after treatment with hematopoietic stem cell transplantation in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(7):1413-9.
247. Zhang X, Ye L, Hu J, Tang W, Liu R, Yang M, et al. Acute response of peripheral blood cell to autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetic patient. *PLoS One.* 2012;7(2):e31887.
-

248. Li L, Shen S, Ouyang J, Hu Y, Hu L, Cui W, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation modulates immunocompetent cells and improves β -cell function in Chinese patients with new onset of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):1729-36.
249. Snarski E, Milczarczyk A, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Król M, et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(4):562-6.
250. Muraro PA, Martin R. Immunological questions on hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32 Suppl 1:S41-4.
251. Muraro PA, Douek DC. Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggression. *Trends Immunol*. 2006;27(2):61-7.
252. Abrahamsson S, Muraro PA. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity*. 2008;41(8):577-84.
253. Deane S, Meyers FJ, Gershwin ME. On reversing the persistence of memory: hematopoietic stem cell transplant for autoimmune disease in the first ten years. *J Autoimmun*. 2008;30(3):180-96.
254. Hügler T, van Laar JM. Stem cell transplantation for rheumatic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(5):217.
255. Marmont AM. Will hematopoietic stem cell transplantation cure human autoimmune diseases? *J Autoimmun*. 2008;30(3):145-50.
256. Van Wijmeersch B, Sprangers B, Dubois B, Waer M, Billiau AD. Autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Multiple Sclerosis: perspective on mechanisms of action. *J Neuroimmunol*. 2008;197(2):89-98.
257. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009;113(1):214-23.
258. Openshaw H, Lund BT, Kashyap A, Atkinson R, Sniecinski I, Weiner LP, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in multiple sclerosis with busulfan and cyclophosphamide conditioning: report of toxicity and immunological monitoring. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6(5A):563-75.
259. Sun W, Popat U, Hutton G, Zang YC, Krance R, Carrum G, et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. *Brain*. 2004;127(Pt 5):996-1008.
260. Darlington PJ, Touil T, Doucet JS, Gaucher D, Zeidan J, Gauchat D, et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Neurol*. 2013;73(3):341-54.
261. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1150:220-9.
262. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niino H, Arinobu Y, et al. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(5):944-52.
-

263. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1998;92(5):1471-90.
264. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(9):835-57.
265. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(2):329-48.
266. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(2):257-72.
267. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol*. 2008;30(4):425-37.
268. Cornelissen J. Hematopoietic reconstitution after hemato- poietic stem cell transplantation. In: Atkinson KA CR, Ritz J, Fibbe WE, Ljungman P, Brenner MK, editor. *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004. p. 160–19.
269. Steingrimsdottir H, Gruber A, Björkholm M, Svensson A, Hansson M. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica*. 2000;85(8):832-8.
270. Storek J, Zhao Z, Liu Y, Nash R, McSweeney P, Maloney DG. Early recovery of CD4 T cell receptor diversity after "lymphoablative" conditioning and autologous CD34 cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(12):1373-9.
271. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol*. 2007;19(5):318-30.
272. Farias KCRM. Avaliação da reconstituição imunológica em pacientes com diabete melito do tipo 1 e esclerose múltipla após transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2006.
273. Tchao NK, Turka LA. Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1079-90.
274. Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(12):823-32.
275. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.
276. Khaled AR, Durum SK. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):817-30.
277. Sprent J, Cho JH, Boyman O, Surh CD. T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol*. 2008;86(4):312-9.
278. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol*. 2001;22(10):564-71.
279. Surh CD, Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin Immunol*. 2005;17(3):183-91.
-

280. Ernst B, Lee DS, Chang JM, Sprent J, Surh CD. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*. 1999;11(2):173-81.
281. Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. 1999;11(2):183-90.
282. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8732-7.
283. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2000;1(5):426-32.
284. Kieper WC, Troy A, Burghardt JT, Ramsey C, Lee JY, Jiang HQ, et al. Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol*. 2005;174(6):3158-63.
285. Min B, Foucras G, Meier-Schellersheim M, Paul WE. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(11):3874-9.
286. Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. 1999;286(5443):1377-81.
287. Swain SL, Hu H, Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science*. 1999;286(5443):1381-3.
288. Neujahr DC, Chen C, Huang X, Markmann JF, Cobbold S, Waldmann H, et al. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol*. 2006;176(8):4632-9.
289. Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med*. 2000;192(4):557-64.
290. Moxham VF, Karegli J, Phillips RE, Brown KL, Tapmeier TT, Hangartner R, et al. Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol*. 2008;180(6):3910-8.
291. Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med*. 2000;192(4):549-56.
292. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant*. 2005;5(3):465-74.
293. Hamilton SE, Wolkers MC, Schoenberger SP, Jameson SC. The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2006;7(5):475-81.
294. Sener A, Tang AL, Farber DL. Memory T-cell predominance following T-cell depletion therapy derives from homeostatic expansion of naive T cells. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2615-23.
295. Thiel A, Alexander T, Schmidt C, Hiepe F, Arnold R, Radbruch A, et al. Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: RK B, A M, editors. *Stem cell therapy for autoimmune diseases*. Georgetown, Texas, USA: Landes Biociences; 2004. p. 206-22.
-

296. van Laar JM. Immune ablation and stem-cell therapy in autoimmune disease. Immunological reconstitution after high-dose immunosuppression and haematopoietic stem-cell transplantation. *Arthritis Res.* 2000;2(4):270-5.
297. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant.* 2010;10(9):2132-41.
298. Paiva RS, Lino AC, Bergman ML, Caramalho I, Sousa AE, Zelenay S, et al. Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(16):6494-9.
299. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:8-27.
300. Kared H, Adle-Biassette H, Foïs E, Masson A, Bach JF, Chatenoud L, et al. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity.* 2006;25(5):823-34.
301. Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, Yuan X, Huang X, et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med.* 2004;10(1):87-92.
302. Bartelink IH, Belitser SV, Knibbe CA, Danhof M, de Pagter AJ, Egberts TC, et al. Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(2):305-13.
303. Szabolcs P. T-lymphocyte recovery and function after cord blood transplantation. *Immunol Res.* 2011;49(1-3):56-69.
304. Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol.* 1997;54(2):131-8.
305. Savani BN, Mielke S, Rezvani K, Montero A, Yong AS, Wish L, et al. Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(10):1216-23.
306. Parkman R, Cohen G, Carter SL, Weinberg KI, Masinsin B, Guinan E, et al. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(9):919-27.
307. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2265-75.
308. Kim DH, Sohn SK, Won DI, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Rapid helper T-cell recovery above $200 \times 10^6/l$ at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(12):1119-28.
309. Fries BC, Khaira D, Pepe MS, Torok-Storb B. Declining lymphocyte counts following cytomegalovirus (CMV) infection are associated with fatal CMV disease in bone marrow transplant patients. *Exp Hematol.* 1993;21(10):1387-92.
-

310. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, Fischer I, Bihler S, Gerneth F, et al. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82(5):1672-8.
311. Berger M, Figari O, Bruno B, Raiola A, Dominiotto A, Fiorone M, et al. Lymphocyte subsets recovery following allogeneic bone marrow transplantation (BMT): CD4+ cell count and transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(1):55-62.
312. Burt RK, Traynor AE, Pope R, Schroeder J, Cohen B, Karlin KH, et al. Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1998;92(10):3505-14.
313. McSweeney PA, Nash RA, Sullivan KM, Storek J, Crofford LJ, Dansey R, et al. High-dose immunosuppressive therapy for severe systemic sclerosis: initial outcomes. *Blood*. 2002;100(5):1602-10.
314. Farge D, Marolleau JP, Zohar S, Marjanovic Z, Cabane J, Mounier N, et al. Autologous bone marrow transplantation in the treatment of refractory systemic sclerosis: early results from a French multicentre phase I-II study. *Br J Haematol*. 2002;119(3):726-39.
315. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(11):631-40.
316. Openshaw H, Nash RA, McSweeney PA. High-dose immunosuppression and hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune disease: clinical review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(5):233-48.
317. Schall R. Estimation in generalized linear models with random effects. *Biometrika*; 1991. p. 719-27.
318. Thiel A, Alexander T, Schmidt A, Hiepe F, Arnold R, Radbruch A, et al. Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: RK B, A M, editors. *Stem cell therapy for autoimmune diseases*. Georgetown, Texas, USA: Landes Biociences; 2004. p. 206-22.
319. Fallen PR, Duarte RF, McGreavey L, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(6):609-16.
320. Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(10):1001-14.
321. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186(9):1407-18.
322. Hamann D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RW. Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood*. 1996;88(9):3513-21.
323. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
-

324. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Möwes B, Radbruch A, et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med*. 2002;195(6):789-94.
325. Burt RK, Craig RM, Milanetti F, Quigley K, Gozdzia P, Bucha J, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe anti-TNF refractory Crohn disease: long-term follow-up. *Blood*. 2010;116(26):6123-32.
326. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
327. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M, Gualandi F, Murialdo A, Inglese M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology*. 2001;57(1):62-8.
328. Carreras E, Saiz A, Marín P, Martínez C, Rovira M, Villamor N, et al. CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple sclerosis: report of toxicity and treatment results at one year of follow-up in 15 patients. *Haematologica*. 2003;88(3):306-14.
329. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. *Diabetes*. 2004;53(1):250-64.
330. Rodacki M, Milech A, Oliveira JE. [C-peptide residual secretion makes difference on type 1 diabetes management?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):322-33.
331. Hills CE, Brunskill NJ. Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(7):565-74.
332. Rebsomen L, Khammar A, Raccach D, Tsimaratos M. C-Peptide effects on renal physiology and diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008:281536.
333. Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W. Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*. 2003;26(3):832-6.
334. Burt RK, Kozak T. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: finding equipoise. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32 Suppl 1:S45-8.
335. Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood*. 2003;102(7):2364-72.
336. Inglese M, Mancardi GL, Pagani E, Rocca MA, Murialdo A, Saccardi R, et al. Brain tissue loss occurs after suppression of enhancement in patients with multiple sclerosis treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(4):643-4.
337. Fassas A. On the evolution of high-dose immunosuppressive therapy with autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2010;2(6):1-4.
338. Kötter I, Daikeler T, Einsele H, Koch S, Lochmann L, Kanz L, et al. Relapse of autoimmune diseases after autologous T cell depleted stem cell transplantation may be triggered by T cells recently emigrated from the thymus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(12):1787-9.
-

339. Zhang L, Bertucci AM, Ramsey-Goldman R, Burt RK, Datta SK. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. *J Immunol.* 2009;183(10):6346-58.
340. Roord ST, de Jager W, Boon L, Wulffraat N, Martens A, Prakken B, et al. Autologous bone marrow transplantation in autoimmune arthritis restores immune homeostasis through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood.* 2008;111(10):5233-41.
341. Wen Y, Ouyang J, Yang R, Chen J, Liu Y, Zhou X, et al. Reversal of new-onset type 1 diabetes in mice by syngeneic bone marrow transplantation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(2):282-7.
342. Dubinsky AN, Burt RK, Martin R, Muraro PA. T-cell clones persisting in the circulation after autologous hematopoietic SCT are undetectable in the peripheral CD34+ selected graft. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(2):325-31.
343. Herrmann MM, Gaertner S, Stadelmann C, van den Brandt J, Böske R, Budach W, et al. Tolerance induction by bone marrow transplantation in a multiple sclerosis model. *Blood.* 2005;106(5):1875-83.
344. Burt RK, Traynor AE, Craig R, Marmont AM. The promise of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(7):521-4.
345. Farge D, Passweg J, van Laar JM, Marjanovic Z, Besenthal C, Finke J, et al. Autologous stem cell transplantation in the treatment of systemic sclerosis: report from the EBMT/EULAR Registry. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(8):974-81.
346. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant.* 1993;12(4):387-98.
347. Verburg RJ, Kruize AA, van den Hoogen FH, Fibbe WE, Petersen EJ, Preijers F, et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with rheumatoid arthritis: results of an open study to assess feasibility, safety, and efficacy. *Arthritis Rheum.* 2001;44(4):754-60.
348. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
349. Koehne G, Zeller W, Stocksclaeder M, Zander AR. Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19(2):149-56.
350. Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol.* 2000;165(4):1733-7.
351. Min B, McHugh R, Sempowski GD, Mackall C, Foucras G, Paul WE. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity.* 2003;18(1):131-40.
352. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999;402(6759):255-62.
353. Freitas AA, Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:83-111.
-

354. Berzins SP, Uldrich AP, Sutherland JS, Gill J, Miller JF, Godfrey DI, et al. Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks. *Trends Mol Med*. 2002;8(10):469-76.
355. Thiel A, Alexander T, Schmidt CA, Przybylski GK, Kimmig S, Kohler S, et al. Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol*. 2008;119(1):22-7.
356. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science*. 1994;265(5177):1395-400.
357. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011;12(6):478-84.
358. Garbi N, Hämmerling GJ, Probst HC, van den Broek M. Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(5):601-8.
359. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*. 2009;30(7):366-73.
360. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*. 1997;89(10):3700-7.
361. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood*. 1997;90(9):3789-98.
362. Peggs KS, Mackinnon S. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2004;124(4):407-20.
363. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1491-7.
364. Gress RE, Emerson SG, Drobyski WR. Immune reconstitution: how it should work, what's broken, and why it matters. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(1 Suppl):S133-7.
365. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
366. Ferraro F, Lymperi S, Méndez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, et al. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra1.
367. DiPersio JF. Diabetic stem-cell "mobilopathy". *N Engl J Med*. 2011;365(26):2536-8.
368. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest*. 2005;115(4):930-9.
369. Te Boekhorst PA, Lamers CH, Schipperus MR, Hintzen RQ, van der Holt B, Cornelissen JJ, et al. T-lymphocyte reconstitution following rigorously T-cell-depleted versus unmodified autologous stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(8):763-72.
370. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. 2009;113(4):769-74.
-

371. Azevedo RI, Soares MV, Barata JT, Tendeiro R, Serra-Caetano A, Victorino RM, et al. IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4⁺ T cells and preferentially expands the CD31⁺ subset in a PI3K-dependent manner. *Blood*. 2009;113(13):2999-3007.
372. Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, Keisler A, Salgo B, Fauchere JC, et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol*. 2007;37(11):3270-80.
373. Dion ML, Sékaly RP, Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol*. 2007;380:197-213.
374. Geenen V, Poulin JF, Dion ML, Martens H, Castermans E, I Hansenne, et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol*. 2003;176(3):305-11.
375. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;355(9218):1875-81.
376. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998;396(6712):690-5.
377. Harari A, Vallelle F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*. 2004;34(12):3525-33.
378. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003;101(11):4260-6.
379. Tanchot C, Rosado MM, Agenes F, Freitas AA, Rocha B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol*. 1997;9(6):331-7.
380. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin Immunol*. 1997;9(6):339-46.
381. Cho JH, Boyman O, Kim HO, Hahm B, Rubinstein MP, Ramsey C, et al. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8⁺ cells driven by IL-2. *J Exp Med*. 2007;204(8):1787-801.
382. Ramsey C, Rubinstein MP, Kim DM, Cho JH, Sprent J, Surh CD. The lymphopenic environment of CD132 (common gamma-chain)-deficient hosts elicits rapid homeostatic proliferation of naive T cells via IL-15. *J Immunol*. 2008;180(8):5320-6.
383. Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol*. 2005;174(10):6039-44.
384. Winstead CJ, Fraser JM, Khoruts A. Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells selectively inhibit the spontaneous form of lymphopenia-induced proliferation of naive T cells. *J Immunol*. 2008;180(11):7305-17.
385. Kassiotis G, Zamoyska R, Stockinger B. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J Exp Med*. 2003;197(8):1007-16.
386. Hagen KA, Moses CT, Drasler EF, Podetz-Pedersen KM, Jameson SC, Khoruts A. A role for CD28 in lymphopenia-induced proliferation of CD4 T cells. *J Immunol*. 2004;173(6):3909-15.
-

387. Gudmundsdottir H, Turka LA. A closer look at homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *J Immunol*. 2001;167(7):3699-707.
388. Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Semin Immunol*. 2005;17(3):201-7.
389. Kim DH, Kim JG, Sohn SK, Sung WJ, Suh JS, Lee KS, et al. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2004;125(2):217-24.
390. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*. 2003;101(7):2711-20.
391. Arosa FA. CD8⁺CD28⁻ T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(1):1-13.
392. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, et al. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003;102(12):4107-14.
393. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. 2004;200(9):1123-34.
394. Singh RP, La Cava A, Wong M, Ebling F, Hahn BH. CD8⁺ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J Immunol*. 2007;178(12):7649-57.
395. Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L, et al. A soluble factor released by CD8⁺CD57⁺ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 1991;77(10):2237-41.
396. Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, et al. CD8^{hi}CD57⁺ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. *Int Immunol*. 1998;10(3):311-23.
397. Sadat-Sowti B, Debré P, Mollet L, Quint L, Hadida F, Leblond V, et al. An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8⁺CD57⁺ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients. *Eur J Immunol*. 1994;24(11):2882-8.
398. Dinesh RK, Skaggs BJ, La Cava A, Hahn BH, Singh RP. CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun Rev*. 2010;9(8):560-8.
399. Trzonkowski P, Zilvetti M, Chapman S, Wieckiewicz J, Sutherland A, Friend P, et al. Homeostatic repopulation by CD28-CD8⁺ T cells in alemtuzumab-depleted kidney transplant recipients treated with reduced immunosuppression. *Am J Transplant*. 2008;8(2):338-47.
400. Selin LK, Welsh RM. Plasticity of T cell memory responses to viruses. *Immunity*. 2004;20(1):5-16.
401. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
402. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008;9(3):239-44.
-

403. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;166(12):7282-9.
404. Verda L, Oyama Y, Craig R, Statkute L, Krosnjar N, Quigley K, et al. Restoration of the CD4+CD25 bright regulatory cell subset in patients with Crohn's disease following autologous non-myeloablative stem cell transplantation (NST). *Blood.* 2005;106(11):2193.
405. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med.* 2004;199(10):1401-8.
406. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol.* 2004;173(12):7259-68.
407. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003;112(9):1437-43.
408. Condomines M, Quittet P, Lu ZY, Nadal L, Latry P, Lopez E, et al. Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol.* 2006;176(11):6631-9.
409. Bayer AL, Jones M, Chirinos J, de Armas L, Schreiber TH, Malek TR, et al. Host CD4+CD25+ T cells can expand and comprise a major component of the Treg compartment after experimental HCT. *Blood.* 2009;113(3):733-43.
410. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(10):2844-53.
411. Winstead CJ, Reilly CS, Moon JJ, Jenkins MK, Hamilton SE, Jameson SC, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia. *J Immunol.* 2010;184(9):4749-60.
-

Apêndices e anexo

Apêndice A – Exemplos de análises de imunofenotipagem de subpopulações celulares do sangue periférico por citometria de fluxo.

Figura A. 1. Análise imunofenotípica de subpopulações de células T e B do sangue periférico.
(A) Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). (B) Porcentagem (%) de marcação dos isotipos controles. Foram feitos *dot plots* de FL1 versus FL2, em seguida foi desenhada uma *gate* R2 na população duplo-positiva para análise de FL3 versus FL4. (C) Controle da *gate* (R1) para exclusão de monócitos da análise. Porcentagem (%) de linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺ (D), linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD8⁺ (E), linfócitos B CD19⁺ (F), linfócitos T CD8⁺CD28⁻ (G) e linfócito T recém-imigrados do timo CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (H).

Figura A. 2. Análise imunofenotípica de subpopulações de células T *naïve* e de memória do sangue periférico.

(A) Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). (B) Porcentagem (%) de marcação dos isotipos controles. (C) Porcentagem (%) de marcação de isotipo controle da *gate* (R2) por histograma. As subpopulações de células T CD4⁺ (D) ou CD8⁺ (F) foram selecionadas por uma *gate* R2 (FL4) ou R3 (FL3), e foram feitos *dot plots* de FL1 *versus* FL2 para análise dos eventos da *gate* R2. Porcentagem (%) de células T *naïve* CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻ (quadrante superior esquerdo), células T de memória central CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ (quadrante superior direito) e células T de memória efetora CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺ (quadrante inferior direito) (E), e das mesmas subpopulações de células T CD8⁺ em (G).

Figura A. 3. Análise imunofenotípica de células T reguladoras do sangue periférico.

(A) Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). (B) Porcentagem (%) de marcação dos isotipos controles. (C) Porcentagem (%) de marcação de isotipo controle da *gate* (R2) por histograma. Foram feitos *dot plots* de FL1 versus FL2, em seguida foi desenhada uma *gate* R2 na população duplo-positiva CD4⁺CD25^{high} (D). Porcentagem (%) de células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (E).

Apêndice B – Reconstituição imunológica dos pacientes com DM1 submetidos ao IAD/TACTH.

Figura B. 1. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos totais (A), linfócitos T CD3^+ (B) e linfócitos B CD19^+ (C). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 2. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com DM1 após o TACTH. Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T auxiliares $CD3^{+}CD4^{+}$ (A) e linfócitos T citotóxicos $CD3^{+}CD8^{+}$ (B). (C) Razão dos valores absolutos de linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}/CD3^{+}CD8^{+}$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 3. Reconstituição de linfócitos T *naïve* e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T *naïve* $CD4^+CD27^+CD45RO^-$ (A), linfócitos T *naïve* $CD8^+CD27^+CD45RO^-$ (B) e de linfócitos T recém-imigrados do timo $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (C). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 4. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μ L) de linfócitos T de memória central CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ (A) e CD8⁺CD27⁺CD45RO⁺ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 5. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T de memória efetora $CD4^+CD27^-CD45RO^+$ (A) e $CD8^+CD27^-CD45RO^+$ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 6. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T supressores $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura B. 7. Reconstituição de linfócitos T reguladores em pacientes com DM1 após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T reguladores $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{FOXP3}^+$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade < 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Apêndice C – Reconstituição imunológica dos pacientes com EM submetidos ao IAD/TACTH.

Figura C. 1. Reconstituição de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos totais (A), linfócitos T CD3^+ (B) e linfócitos B CD19^+ (C). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 2. Reconstituição de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em pacientes com EM após o TACTH. Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T auxiliares $CD3^{+}CD4^{+}$ (A) e linfócitos T citotóxicos $CD3^{+}CD8^{+}$ (B). (C) Razão dos valores absolutos de linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}/CD3^{+}CD8^{+}$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 3. Reconstituição de linfócitos T *naïve* e de linfócitos recém-imigrados do timo em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T *naïve* $CD4^{+}CD27^{+}CD45RO^{-}$ (A), linfócitos T *naïve* $CD8^{+}CD27^{+}CD45RO^{-}$ (B) e de linfócitos T recém-imigrados do timo $CD3^{+}CD4^{+}CD45RA^{+}CD31^{+}$ (C). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 4. Reconstituição de linfócitos T de memória central em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T de memória central $CD4^{+}CD27^{+}CD45RO^{+}$ (A) e $CD8^{+}CD27^{+}CD45RO^{+}$ (B). As extremidades da caixa indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 5. Reconstituição de linfócitos T de memória efetora em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μ L) de linfócitos T de memória efetora CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺ (A) e CD8⁺CD27⁻CD45RO⁺ (B). As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 6. Reconstituição de linfócitos T supressores em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T supressores $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Figura C. 7. Reconstituição de linfócitos T reguladores em pacientes com EM após o TACTH.

Valores absolutos (linfócitos/ μL) de linfócitos T reguladores $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{FOXP3}^+$. As extremidades das caixas indicam o 25th e 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. *: $p < 0,05$ entre o período assinalado (mês) e o período pré-transplante (Pré). As faixas horizontais sombreadas representam valores de referência obtidos para o grupo controle (10 indivíduos saudáveis com idade > 30 anos), onde as linhas pontilhadas indicam o 25th e o 75th percentis.

Anexo A - EDSS (*Expanded Disability Status Score*) (142).

Valor EDSS	Sintomas
0	Normal
1	Sem incapacidade, mas com alterações neurológicas em 1 sistema
1,5	Sem incapacidade, mas com alterações neurológicas em 2 sistemas
2	Incapacidade motora discreta
2,5	Incapacidade discreta
3	Incapacidade moderada
3,5	Deambulação plena com incapacidade moderada
4	Deambulação plena de até 500m
4,5	Deambulação plena até 300m, com alguma limitação e mínima assistência
5	Deambulação plena até 200m, com alguma limitação e moderada assistência
5,5	Deambulação plena até 100m, com limitações importantes
6	Assistência constante, intermitente ou com auxílio de bengala, muleta ou suporte
6,5	Não anda, restrito a cadeira de rodas, transferência para cama e outros sem auxílio
7	Não anda, restrito a cadeira de rodas, transferência para cama e outros com auxílio
7,5	Restrito ao leito; às vezes consegue transferir-se sem auxílio para a cadeira de rodas
8	Restrito ao leito
8,5	Restrito ao leito, necessita de ajuda; comunica-se e alimenta-se sozinho
9	Restrito ao leito, necessita de ajuda; não consegue se alimentar ou comunicar
10	Morte devida à esclerose múltipla

Anexo B - Peptídeo C dos pacientes com DM-1 antes e diversos períodos após o TACTH (202).

Paciente	Peptídeo C* AUC ng/mL (por 2 horas)						
	Pré-TACTH	D+180	D+360	D+720	D+1080	D+1440	D+1800
ALSR	80,21	150,45	258,31	-	614,95	454,08	462,69
WLS	477,19	775,83	635,80	383,86	165,41	141,84	189,88
MGB	79,76	136,40	83,38	-	-	-	-
RLFS	10,88	172,20	211,18	382,48	233,84	219,79	308,61
CPS	496,68	658,00	340,33	452,27	382,93	246,10	249,70
TAS	85,65	285,95	460,42	496,22		420,54	205,29
RAOA	32,63	244,26	520,69	909,52	790,79	516,16	457,25
PMR	77,49	157,25	462,23	181,27	-	182,63	-
CTO	29,91	158,16	422,36	541,99	-	292,75	518,43
VTR	216,16	252,42	422,81	467,22	410,12	208,46	241,99
ISJ	51,66	63,44	107,40	73,87	470,39	135,95	530,21
RRS	130,06	818,43	856,95	1481,42	653,47	632,63	330,81
JFA	134,59	201,66	639,88	701,06	812,54	829,76	645,77
LTF	29,46	666,16	572,36	1188,22	648,49	728,70	353,02
FCC	429,61	-	578,25	608,16	444,56	250,60	244,71
HFG	173,56	972,51	318,13	719,92	721,90	825,23	585,04
TDP	163,59	648,94	130,51	746,37	676,59	426,43	259,67
GBA	448,19	611,78	532,93	127,34	157,70	87,01	-
TFK	405,59	520,24	528,85	196,22	91,09	103,32	-
MSGs	355,29	198,49	277,79	112,39	-	124,62	-
Média (DP)	195,4 (171,2)	404,8 (284,3)	418 (201,8)	542,7 (378,1)	484,9 (240,7)	359,3 (245,6)	372,2 (148,8)

* A quantificação dos níveis séricos do peptídeo-C foi realizada utilizando o "*Human C-Peptide radioimmunoassay kit*" (Millipore, MA, USA). AUC: área sob a curva. TACTH: transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas