UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação imunofenotípica, funcional e gênica de subpopulações
de células B em pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao
transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas**

João Rodrigues Lima Júnior

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação imunofenotípica, funcional e gênica de subpopulações de células B em pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientado: João Rodrigues Lima Júnior

Orientadora: Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim

Co-orientadora: Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Ribeirão Preto
2019

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.

Lima-Júnior, João Rodrigues

Avaliação imunofenotípica, funcional e gênica de subpopulações de células B em pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. Ribeirão Preto, 2019.

140 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Malmegrim, KC

1. Esclerose sistêmica.
2. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiética.
3. Células B.
4. Reconstituição imunológica.
5. Imunorregulação.
6. Autoimunidade. IL-10.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Rodrigues Lima Júnior

Avaliação imunofenotípica, funcional e gênica de subpopulações de células B em pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências e Biotecnologia

Orientador(a): Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos nº2013/08135-2, nº2016/24443-7, nº2018/20343-3), da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Centro de Terapia Celular (INCTC) do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedico esse trabalho à minha mãe, Arlete, com todo meu amor

Às minhas irmãs, Débora e Danielle, com eterna gratidão

À minha noiva, Claudinéia, com carinho

Agradecimentos

Agradeço à **Deus**, pela força e sabedoria;

À minha **mãe, Arlete Maria de Souza**, meu maior exemplo de vida, minha mentora e grande incentivadora. Devo a ela tudo que sou, e tudo que conquistei;

Às minhas **irmãs, Débora e Danielle**, pela participação ativa e crucial na minha formação;

À minha **noiva, Claudinéia Pereira Costa**, por toda ajuda e companheirismo ao longo desses anos;

À **profa. Dra. Kelen Malegrim** pela oportunidade, confiança e ensinamentos que permitiram a realização desse trabalho e o meu crescimento pessoal e profissional;

À **profa. Dra. Maria Carolina**, pela oportunidade;

À **profa. Dra. Deborah Dunn-Walters**, pela simpatia e por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Surrey;

Ao meu grande amigo, **Luciano Costa**, pela irmandade

Ao meu grande amigo, **Lucas Coelho**, pelos conselhos;

Ao meu grande amigo de infância e mentor de assuntos raciais, **Lourimar Martins**, por expandir o meu conhecimento para além da imunologia;

Ao meu amigo, **Osneilton Guedes**, pelo respeito e suporte dado a minha mãe neste período em que me encontro longe de casa;

Aos **pacientes**, pela boa vontade e altruísmo por com o projeto;

À farmacêutica-bioquímica **Analuiza Souza Costa**, do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela amizade e pelo apoio essencial no início da minha caminhada em Ribeirão Preto;

Ao farmacêutico-bioquímico **José Luiz Morato**, do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela amizade e, sobretudo, pelos conselhos que me foram dados;

À diretoria científica e administrativa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e seus funcionários. Em especial a **Dalvinha**, por toda a ajuda e boa vontade.

À biomédica **Fabiana Rossetto de Moraes**, FCFRP-USP, pela atenção em realizar as leituras no citômetro de fluxo;

Aos amigos do Laboratório de Cultura Celular pelo apoio, paciência e amizade: Maynara Santana, Rafael Biaggio, Amanda Mizukami, Rafaela Freitas, Nádia Noronha, Juaça Cominal, Júlia Teixeira, Luciana Jardulli, Mario Soares Neto.

Aos **professores** do Programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP por contribuírem para o meu aprendizado e crescimento acadêmico;

Aos **coordenadores e funcionários** do Programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar;

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP**, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**), pelo suporte financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo suporte financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Epigrafe

“Ser negro no Brasil é, pois, com frequência, ser objeto de um olhar enviesado. A chamada boa sociedade parece considerar que há um lugar predeterminado, lá em baixo, para os negros e assim tranquilamente se comporta. Logo, tanto é incômodo haver permanecido na base da pirâmide social quanto haver "subido na vida".

Milton Santos, Ser negro no Brasil hoje

A cada 23 minutos um jovem negro é assassinado no Brasil...

...Contemplem o trabalho de mais um sobrevivente.

RESUMO

LIMA-JÚNIOR, J. R. **Avaliação imunofenotípica, funcional e gênica de subpopulações de células B em pacientes com esclerose sistêmica submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas.** 2019. 140f. Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune inflamatória crônica, caracterizada por alterações microvasculares e diferentes graus de fibrose da pele e de múltiplos órgãos. Atualmente, o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) é o único tratamento capaz de promover remissão clínica de longo prazo em pacientes com ES, sem a necessidade do uso de terapias adicionais. No entanto, os mecanismos imunológicos envolvidos nessa terapia não são ainda completamente compreendidos, incluindo o papel de subpopulações de células B. Nesse contexto, nesse trabalho avaliamos a reconstituição quantitativa e funcional de subpopulações de células B convencionais e reguladoras (Bregs) pacientes com ES tratados com TACTH (n=24). As seguintes subpopulações de células B do sangue periférico foram analisadas por citometria de fluxo, antes e após 30, 60, 120, 180 e 360 dias do TACTH: CD19⁺IgD⁺CD27⁻ (naïve), CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (memória sem mudança de classe de isotipo), CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (memória com mudança de classe de isotipo), CD19⁺IgD⁻CD27^{hi} (plasmócito), CD19⁺IgD⁻CD27⁻ (memória duplo negativa), CD19⁺CD38⁻IgD⁺ (Bm1, naïve virgem), CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2, naïve ativada), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁺ (Bm2', pré centro germinativo), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁻ (Bm3+4, centroblasto+centrócito), CD19⁺CD38⁺IgD⁻ (early Bm5, memória recente) e CD19⁺CD38⁻IgD⁻ (late Bm5, memória tardia), CD19⁺PD1⁺, CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻ (B1), CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (Breg transicional), CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (Breg B10). Após o transplante, os pacientes com ES apresentaram diminuição significativa do escore cutâneo de Rodnan modificado, dos níveis séricos de proteína C reativa e do autoanticorpo anti-Scl70. Seis pacientes apresentaram reativação da doença durante o seguimento pós-transplante. As células B naïve foram eliminadas pelo regime de condicionamento e 360 dias pós-transplante apresentaram número absoluto maior que os encontrados no período pré-transplante. O número absoluto de células B de memória diminuiu transientemente, retornando aos valores basais 360 dias após o transplante. Paralelamente, logo após o transplante, observamos aumento da expressão de PD-1 nas células B, aumento transiente dos níveis séricos de BAFF e diminuição transiente dos níveis séricos de APRIL. Pacientes reativados apresentaram aumento de células B PD-1⁺ logo após o transplante. Observamos um aumento significativo de Bregs transicionais nos pacientes que responderam ao TACTH em comparação com os que reativaram a doença. As Bregs B10 aumentaram a produção de IL-10 de maneira transiente após o TACTH, enquanto que as Bregs transicionais apresentaram um aumento de IL-10 persistente ao longo de todo o seguimento. Corroborando esses achados, a fosforilação das proteínas intracelulares ERK1/2 e p38 MAPK, relacionadas a produção de IL-10 por células B, aumentou após o transplante, enquanto a fosforilação de STAT3 manteve-se inalterada. Além disso, as Bregs transicionais readquiriram a capacidade de suprimir a proliferação de células T CD4⁺, bem como a produção de TNF- α e IFN- γ por estas células. Por outro lado, a produção de TGF- β por células B maduras diminuiu transientemente,

enquanto a produção de IL-6 diminuiu de maneira persistente ao longo do seguimento pós-transplante. Observamos também uma modulação da expressão de 13 genes relacionados a resposta inflamatória e autoimunidade 360 dias pós-TACTH, em comparação ao período pré-transplante. Em conjunto, sugerimos todos esses mecanismos atuam sinergicamente no restabelecimento da autotolerância imunológica e diminuição da inflamação e fibrose nos pacientes com ES que respondem satisfatoriamente ao TACTH. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuíram para aumentar o conhecimento sobre a reconstituição numérica e funcional do compartimento de células B após o TACTH em pacientes com ES. Este conhecimento poderá futuramente contribuir para melhorias do protocolo clínico de TACTH para ES e outras doenças autoimunes.

Palavras-chave: esclerose sistêmica, transplante autólogo de células-tronco hematopoiética, células B, reconstituição imunológica, imunorregulação, autoimunidade, IL-10

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, J. A. **Immunophenotypic, functional and gene evaluation of B cell subsets in patients with systemic sclerosis undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation.** 2019. 140f Thesis Doctoral. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic inflammatory autoimmune disease, which is characterized by microvascular changes and different degrees of skin and multiple organ fibrosis. Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is currently the only treatment capable of promoting long-term clinical remission in SSc patients without the need for additional therapies. However, the immunological mechanisms involved in this therapy are not yet fully understood, including the role of B cell subpopulations. In this context, in this work we evaluated the quantitative and functional reconstitution of conventional and regulatory B cell subpopulations (Bregs) in patients with SSc treated with AHSCT (n=24). The following peripheral blood B cell subpopulations were analyzed by flow cytometry, before and after 30, 60, 120, 180 and 360 days after AHSCT: CD19⁺IgD⁺CD27⁻ (naive), CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (memory with class switch), CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (memory without class switch), CD19⁺IgD⁻CD27^{hi} (plasmócito), CD19⁺IgD⁻CD27⁻ (memory double negative), CD19⁺CD38⁻IgD⁺ (Bm1, naive), CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2, activated naive), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁺ (Bm2', pre-germinative center), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁻ (Bm3+4, centroblasts+centrocytes), CD19⁺CD38⁺IgD⁻ (early memory Bm5) e CD19⁺CD38⁻IgD⁻ (late memory Bm5), CD19⁺PD1⁺, CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻ (B1 cells), CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (transitional Breg), CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (B10 Breg). After transplantation, patients with SSc had a significant decrease in modified Rodnan skin score, serum reactive C protein and anti-Scl70 autoantibody. Six patients had disease reactivation during the post-transplant follow-up. Naive B cells were eliminated by the conditioning regimen and 360 days after transplantation showed hier absolute number than those found in the pre-transplantation period. The absolute number of memory B cells decreased transiently, returning to baseline 360 days after transplantation. In parallel, early after transplantation, we observed increased expression of PD-1 in B cells, transient increase in serum BAFF levels, and transient decrease in serum APRIL levels. Reactivated patients had increased PD-1⁺ B cell numbers early after transplantation. We observed a significant increase of transitional Bregs in patients who responded to AHSCT compared with those who reactivated the disease. Bregs B10 increased transiently the IL-10 production after AHSCT, while transitional Bregs showed a persistent increase of IL-10 production throughout the follow-up. Corroborating these findings, the phosphorylation of intracellular proteins ERK1/2 and p38 MAPK, which is related to B-cell IL-10 production, increased after transplantation, while STAT3 phosphorylation remained unchanged. In addition, transitional Bregs have recovered the ability to suppress CD4⁺ T cell proliferation, as well as the production of TNF- α and IFN- γ by these cells. On the other hand, TGF- β production by mature B cells decreased transiently, while IL-6 production persistently decreased throughout the post-transplant follow-up. We also observed a modulation of expression of 13 genes related to inflammatory response and autoimmunity 360 days post-AHSCT, compared to the pre-transplant period. Altogether, we suggest that these mechanisms act synergistically in restoring immune self-tolerance and decreasing

inflammation and fibrosis in SSc patients who respond satisfactorily to AHSCT. The results obtained in this work contributed to increase the knowledge about the numerical and functional reconstitution of the B cell compartment after AHSCT in patients with SSc. This knowledge may contribute in the future to improvements in the clinical protocol of AHSCT for SSc and other autoimmune diseases.

Keywords: systemic sclerosis, autologous hematopoietic stem cell transplantation, B cells, immune reconstitution, immunoregulation, autoimmunity, IL-10

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos imunomoduladores de células B reguladoras humanas.....	11
Figura 2. Sequência esquemática do TACTH.....	14
Figure 3. Reconstituição imunológica após TACTH.....	18
Figure 4. Evolução clínico-laboratorial dos pacientes com ES tratados com TACT..	45
Figure 5. Reconstituição das subpopulações de células B naïve em pacientes com ES tratados com TACTH.....	46
Figure 6. Reconstituição das subpopulações de células B de memória em pacientes com ES tratados com TACTH.....	47
Figure 7. Reconstituição das subpopulações de células B convencionais em pacientes com ES tratados com TACTH.....	49
Figura 8. Reconstituição da subpopulações de células B de memória tipo B1 (CD20+CD27+CD43+CD69-) em pacientes com ES tratados com TACT.....	52
Figura 9. Reconstituição da subpopulações de células B PD-1+ em pacientes com ES tratados com TACTH.....	53
Figure 10. Análise quantitativa e qualitativa da subpopulação de células B reguladoras (Bregs) CD19+CD24hiCD38hi em pacientes com ES tratados com TACTH.....	54
Figura 11. Proliferação de células T efetoras e produção de citocinas intracelulares por estas após estímulo in vitro na presença ou ausência de Bregs.....	56
Figure 12. Análise quantitativa e qualitativa da subpopulação de Bregs CD19+CD24hiCD27+ em pacientes com ES tratados com TACTH.....	58
Figura 13. Frequência de células B produtoras de IL-6 ou TGF- β 1 em paciente com ES tratados com TACTH.....	59
Figure 14. Fosforilação das proteínas sinalizadoras ERK1/2, p38MAPK e STAT3 em células B CD19+ de pacientes com ES tratados com TACTH.....	60
Figure 15. Concentração sérica das citocinas BAFF e APRIL em pacientes com ES tratados com TACTH.....	62

Figura 16. Perfil de expressão gênica em pacientes com ES tratados com TACTH.....	63
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos em pacientes com ES tratados com TACTH.....	65
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

- April - do inglês “*proliferation-inducing ligand*” ou ligante indutor de proliferação
- ATG - do inglês “*anti-thymocyte globulin*” ou globulina antitimocitária
- BAFF – do inglês “*B-cell activating fator*” ou fator ativador de células B
- BCL6 - do inglês “*B-cell CLL/lymphoma 6*”
- BMPR2 - do inglês “*bone morphogenetic protein receptor 2*” ou receptor da proteína morfogenética óssea 2
- BMP6 - do inglês “*bone morphogenetic protein 6*” ou proteína morfogenética óssea 6
- B2M – do inglês “*Beta-2-microglobulin*” ou beta-microglobulina 2
- CCL- do inglês “*C-C motif chemokine ligand*”
- CCR – do inglês “*C-C motif chemokine receptor*”
- CD - do inglês “*cluster of differentiation*”
- CEBPB – do inglês “*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta*”
- CRP – do inglês “*C-reactive protein*” ou proteína C reativa
- CSF1 – do inglês “*Colony stimulating factor 1*” ou fator estimulador de colônia 1
- Ct - do inglês “*threshold cycle*”
- CTH - células-tronco hematopoéticas
- CTLA-4 - do inglês “*citotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*” ou molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico
- CXCL – do inglês “*C-X-C motif chemokine ligand*”
- CXCR – do inglês “*C-X-C chemokine receptor*”
- C3 – do inglês “*complemente componente 3*” ou componente 3 do complemento
- C3AR1 - do inglês “*complement component 3a receptor 1*” ou receptor 1 do componente 3a do complemento
- DAMP - do inglês “*damage-associated molecular patterns*” ou padrões moleculares associados ao dano
- DNA - do inglês “*desoxiribonucleic acid*” ou ácido desoxirribonucleico
- DECH - doença do enxerto contra o hospedeiro
- FASLG do inglês “*Fas ligand*” ou ligante de Fas
- FOXP3 - do inglês “*forkhead box P3*”
- GAPDH - do inglês “*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*” ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

G-CSF - do inglês "*granulocyte-colony stimulating factor*" ou fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF - do inglês "*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*" fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HGDC - do inglês "*Human Genomic DNA Contamination*"

HGF - do inglês "*hepatocyte growth factor*" ou fator de crescimento de hepatócitos

HK – do inglês "*Housekeeping gene*"

HLA - do inglês "*human leukocyte antigen*" ou antígeno leucocitário humano

HPLC - do inglês "*high performance liquid chromatography*" ou cromatografia líquida de alta eficiência

HPRT1 - do inglês "*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*"

ICAM-1 - do inglês "*intercellular adhesion molecule 1*" ou *molécula de adesão celular-vascular 1*

IFN- γ - do inglês "*gamma interferon*" ou interferon gama

IL- interleucina

IL-2R α - do inglês "*IL-2 receptor alpha chain*" subunidade alfa do receptor da IL-2

iNKT – do inglês "*T cells natural killers invariant*" ou células T matadoras naturais invariantes

ITGB2 – do inglês "*Integrin beta 2*" ou integrina beta 2

KNG1 – do inglês "*Kininogen 1*" ou cininogenio

LDH - lactato desidrogenase

LIP - do inglês "*lymphopenia induced proliferation*" ou proliferação induzida por linfopenia

LPS - lipopolissacarídeo

LTA – do inglês "*Lymphotoxin alpha*" ou linfotóxina alfa

LTB - do inglês "*Lymphotoxin beta*" ou linfotóxina beta

LY96 - do inglês "*Lymphocyte antigen 96*"

MAC - do inglês "*myeloablative conditioning*" ou condicionamento mieloablativo

MCP-1 - do inglês "*monocyte chemoattractant protein-1*" ou proteína quimioatraente de monócitos-1

MHC - do inglês "*major histocompatibility complex*" ou complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α - do inglês "*macrophage inflammatory protein- 1 alpha*" ou proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa

MIP-1 β - do inglês "*macrophage inflammatory protein- 1 beta*" ou proteína inflamatória de macrófagos 1 beta

MYD88 – do inglês "*Myeloid differentiation primary response 88*" ou fator de diferenciação mieloide 88

NFKB1 – do inglês "*Nuclear factor kappa B subunit 1*" ou subunidade 1 do fator nuclear Kapp B

NK - do inglês "*natural killers*" ou matadoras naturais

NR3C1 - do inglês "*Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*"

NRT – do inglês "*No Reverse Transcription Control*"

NTC – do inglês "*No Template Control*"

PAMP – do inglês "*pathogen-associated molecular pattern*" ou padrões moleculares associados à patógenos

PBMC - do inglês "*peripheral blood mononuclear cells*" ou células mononucleares de sangue periférico

PBS - do inglês "*phosphate buffer saline*" ou tampão salina fosfato

PCR - do inglês "*polymerase chain reaction*" ou reação de polimerização em cadeia

PD-1 - do inglês "*programmed cell death 1*" ou proteína de morte celular programada 1

PDL-1 - do inglês "*programmed cell death-ligand 1*" ou ligante da proteína de morte celular programada 1

PPC - do inglês "*Positive PCR Control*"

PTGS2 - do inglês "*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*" ou prostaglandina endoperoxído sintase 2

Reg3 α - do inglês "*regenerating islet-derived protein 3 alpha*" ou membro 3 alfa da família de regeneração

RIC - do inglês "*reduced-intensity conditioning*" condicionamento de intensidade reduzida

RIPK2 - do inglês "*Receptor-interacting serine-threonine kinase 2*" ou receptor RIP da família da serina/treonina proteína quinase

RNA - do inglês "*ribonucleic acid*" ou ácido ribonucleico

RPLP0 – do inglês "*Ribosomal protein large P0*"

RTC - do inglês "*Reverse Transcription Control*"

SELE - Selectina E

TA - temperatura ambiente

TCTH - transplante de células-tronco hematopoéticas

TGF- β – do inglês “*transforming growth factor beta*” ou fator de crescimento transformante beta

TGI - trato gastrointestinal

TIRAP – do inglês “*Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*” ou proteína adaptadora contendo domínio TIR

TNF- α - do inglês “*tumor necrosis factor alpha*” ou fator de necrose tumoral alfa

TNFSF14 – do inglês “*Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 14*”

TOLLIP – do inglês “*Toll interacting protein*” ou proteína de interação Toll

TLR – do inglês “Toll-like receptor” ou receptor do tipo *toll*

VCAM-1 - do inglês “*vascular-cell adhesion molecule 1*” ou molécula de adesão intercelular 1

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1. Introdução	2
1.1 Esclerose sistêmica	2
1.2 Resposta imune inata na ES	4
1.3 Resposta imune adaptativa na ES.....	4
1.3.1 Células T efetoras.....	4
1.3.2 Células T reguladoras.....	5
1.3.3 Células B efetoras	6
1.3.4 Células B reguladoras.....	7
1.4 Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas para ES	11
1.4.1 Mecanismos imunológicos do TACTH	16
2. Justificativa e hipótese	22
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. Delineamento experimental	27
5. Casuística, materiais e métodos	29
5.1 Pacientes com esclerose sistêmica	29
5.2 Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas.....	29
5.2.1 Mobilização das células-tronco hematopoiéticas.....	29
5.2.2 Regime de condicionamento.....	30
5.2.3 Infusão de células-tronco hematopoiéticas.....	30
5.2.4 Seguimento dos pacientes após o transplante	30
5.3 Avaliação do escore de Rodman, dos níveis de autoanticorpo, e da proteína C reativa	31
5.4 Imunofenotipagem das subpopulações de células B no sangue periférico	31
5.5 Congelamento de soro.....	33
5.6 Avaliação da produção de citocinas por Bregs e células B efetoras	33
5.7 Avaliação da fosforilação de proteínas intracelulares em células B	34
5.8 Avaliação da proliferação e de produção de citocinas por células T efetoras	35
5.9 Extração de RNA a partir de células mononucleares do sangue periférico	36
5.10 Validação da qualidade e integridade do RNA	36
5.11 Transcrição reversa do RNA	37

5.12 RT ² Profiles PCR array	37
5.13 Dosagens de citocinas no soro	39
5.14 Dosagem de Proteína C reativa	40
5.15 Anti-Scl-70	40
6. Análise estatística.....	42
7. Resultados.....	44
7.1 Resultados clínicos	44
7.2 Reconstituição de subpopulações de células B convencionais	45
7.3 Reconstituição das células B reguladoras.....	53
7.3.1 Células B reguladoras CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	53
7.3.2 Células B reguladoras CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	57
7.4 Avaliação da produção de citocinas pró-fibróticas por células B	58
7.5 Avaliação da fosforilação das proteínas de sinalização intracelular STAT3, ERK1/2 e p38MAPK.....	59
7.6 Quantificação sérica das citocinas BAFF e APRIL	61
7.7 Análise da expressão diferencial de genes envolvidos com resposta inflamatória e autoimunidade em pacientes com ES tratados com TACTH.....	62
8. Discussão.....	67
8.1 Resposta clínica dos pacientes com ES após o TACTH	67
8.2 Cinética de reconstituição de células B após o TACTH	68
8.2.1 Células B naïve	68
8.2.2 Células B de memória convencionais.....	69
8.2.3 Células B de memória do tipo B1	71
8.3 Cinética de reconstituição das células B reguladoras	72
8.4 Diminuição do perfil pró-fibrótico das células B após o TACTH.....	74
8.5 Análise de expressão gênica	75
8.6 Considerações finais	77
9. Conclusão.....	80
Referências Bibliográficas.....	82
APÊNDICE 1 – Estratégia de gating para a avaliação de subpopulações de células B convencionais	102
APÊNDICE 2 – Estratégia de gating para a avaliação de subpopulações de células B do tipo B1.....	103
APÊNDICE 3 – Estratégia de gating para a avaliação de subpopulações de células B reguladoras.....	104
APÊNDICE 4 – Estratégia de gating para a avaliação da produção de citocinas por células B.....	105
APÊNDICE 5 – Estratégia de gating para a avaliação da fosforilação de proteínas em células B.....	106

APÊNDICE 6 – Estratégia de gating nos ensaios depleção das células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} nas amostras de PBMCs.....	107
APÊNDICE 7 – Estratégia de gating para a avaliação da produção de citocinas por células T	108
APÊNDICE 8 – Estratégia de gating para a avaliação da proliferação de células T.....	109
APÊNDICE 9 – Esquema geral dos estágios de desenvolvimento das subpopulações de células B convencionais, baseado na expressão dos marcadores IgD e CD27.....	110
APÊNDICE 10 – Esquema geral dos estágios de desenvolvimento das subpopulações de células B convencionais, baseado na expressão dos marcadores IgD e CD38.....	111
ANEXO - Aprovação do estudo no comitê de ética.....	113

Introdução

1. Introdução

1.1 Esclerose sistêmica

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune inflamatória crônica, que acomete o tecido conjuntivo e é caracterizada por alterações microvasculares e diferentes graus de fibrose da pele e múltiplos órgãos internos (Allanore et al. 2015; Denton e Khanna 2017; Sakkas et al. 2015).

A ES acomete principalmente mulheres (4:1 homens) com idade entre 30 e 45 anos e possui uma taxa de prevalência de 150-300 casos por milhão de habitantes (Ranque and Mouthon 2010). Embora possua uma taxa de prevalência menor em comparação a outras doenças reumáticas, a ES possui uma das maiores taxas de mortalidade, sendo 55,1% em 5 anos e 77,9% em 10 anos após o diagnóstico (Elhai et al. 2015) .

A etiologia da ES permanece pouco compreendida, a hipótese é de que a doença seja desencadeada por fatores ambientais (e.g. infecção, gestação, drogas, raios ultravioleta, exposição ocupacional a sílica e/ou solventes orgânicos) que ao atuarem em pessoas geneticamente susceptíveis, iniciam uma complexa interação de processos vasculares, imunológicos e fibróticos (Katsumoto et al. 2011; Mora 2009; Pattanaik et al. 2015).

Diversos estudos apontam que o dano endotelial é um processo primário na patogênese da ES. Análises histopatológicas de pele de pacientes com ES em fases iniciais da doença revelaram alterações compatíveis com células endoteliais danificadas e/ou em processo de apoptose, meses antes do aparecimento da fibrose tecidual (Fleischmajer et al. 1977; Fleischmajer 1976; Fleming and Schwartz 2008; Prescott et al. 1992).

A disfunção do endotélio vascular resulta em aumento da produção de agentes vasoconstritores, como a endotelina-1, e na diminuição de agentes vasodilatadores, como óxido nítrico e prostaciclina (Matucci-Cerinic et al. 2013). Além disso, ocorre o aumento da expressão de moléculas de adesão, dentre as quais podemos destacar a molécula de adesão vascular 1 (VCAM, do inglês, *Vascular cell adhesion molecule 1*) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês, *Intercellular adhesion molecule 1*). Ocorre também o aumento de quimiocinas, tais como, a proteína de quimioatração de monócitos-1 (MCP-1, do

inglês, *Monocyte chemotactic protein-1*) e do ligante de quimiocina CC 18 (CCL18, do inglês, Chemokine (C-C motif) ligand 18) (Elhai et al. 2019; Pattanaik et al. 2011)). Esse desbalanço homeostático envolvendo quimiocinas e moléculas de adesão promove a proliferação de pericitos, ativação plaquetária, geração de espécies reativas de oxigênio e recrutamento de leucócitos. Os leucócitos presentes no infiltrado secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interferon gama (IFN- γ , do inglês, *Interferon gamma*) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*), favorecendo a vasculopatia, dano tecidual, quebra de tolerância imunológica e o processo de fibrose. (Danieli et al. 2009; Rajkumar et al. 2005; Trojanowska 2010; Wynn 2004).

A vasculopatia na ES é caracterizada pela oclusão fibro-intimal de pequenos vasos e episódios vaso-espásticos provocados pelo frio ou estresse. Esta manifestação, conhecida como fenômeno de Raynaud, leva a isquemia tecidual e, na maioria dos casos, precede os demais sintomas da doença (Matucci-Cerinic et al. 2013; Wigley and Flavahan 2016). A vasculopatia também pode se manifestar como hipertensão arterial pulmonar, crise de esclerodermia renal e, no coração, pode ocorrer isquemia e reperfusão, levando ao processo de necrose e alterações arrítmicas. O envolvimento cardiopulmonar na ES é a principal causa de morte desses pacientes (Farge et al. 2017b; Rangarajan et al. 2017).

A fibrose, considerada a marca registrada da ES, é resultado da deposição excessiva de componentes da matriz extracelular na pele e órgãos internos. Acredita-se que a fibrose seja causada por uma falha no reparo tecidual, resultando no aumento da ativação e diferenciação dos fibroblastos residentes em miofibroblastos e, conseqüentemente, produção excessiva de colágeno e outras proteínas envolvidas na fibrogênese, tais como, elastina, proteoglicanas, IL-6, e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β , do inglês, *Transforming growth factor beta*). A deposição excessiva de colágeno aumenta a rigidez tecidual e diminui a elasticidade dos órgãos afetados, resultando em estresse mecânico (Bhattacharyya et al. 2012; Ho et al. 2014).

O diagnóstico preciso e precoce da ES é bastante desafiador devido à natureza heterogênea da doença. Atualmente, duas formas clínicas baseadas na medida de acometimento cutâneo são convencionalmente usadas para descrever os pacientes: ES cutânea limitada (ESI) e ES cutânea difusa (ESd) (Hoogen et al. 2013; Snowden et al. 2018). A ESd comumente inicia-se com lesões simétricas nos dedos

e edema nas mãos, pouco tempo após da instalação do fenômeno de Raynaud. O edema evolui para induração e fibrose, passando a envolver os braços e antebraços, face, tronco e membros inferiores. Além disso, o acometimento cutâneo ocorre de forma rápida e progressiva, muitas vezes com manifestações viscerais e presença de calcinose. Em contraste, a ESI começa com o fenômeno de Raynaud, que na maioria dos pacientes permanece como a única manifestação clínica por muitos anos. A fibrose cutânea e o acometimento pulmonar da ESI é menos extensa e de progressão lenta em comparação com a ESd (Elhai et al. 2015; Gordon and Domsic 2016).

1.2 Resposta imune inata na ES

As células da imunidade inata desempenham papel um importante na fisiopatologia da ES. Através de análises de expressão gênica, foi possível identificar que monócitos, macrófagos e células dendríticas plasmocitoides apresentam uma superexpressão de genes regulados por interferon do tipo 1 (e.g. IFN- α e IFN- β), os quais estão correlacionados com a atividade da doença (Assassi et al. 2010; Brkic et al. 2016).

Além disso, tem sido proposto que lesões por isquemia/reperfusão tecidual decorrentes da vasculopatia podem promover um processo inflamatório estéril, que resulta na geração de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês, *Damage-associated molecular patterns*). Os DAMPs compreendem um extenso repertório de moléculas do hospedeiro liberadas por células danificadas ou em apoptose, que podem ser reconhecidas pelas células do sistema imune inato via receptores do tipo TLR (TLR, do inglês, *toll-like receptor*) e desencadear uma resposta inflamatória exacerbada e consequente fibrose (Bhattacharyya et al. 2017; Bhattacharyya et al. 2013; Fang et al. 2016; Stifano et al. 2014).

1.3 Resposta imune adaptativa na ES

1.3.1 Células T efetoras

Estudos *in vitro* tem demonstrado o envolvimento das células T na patogênese da ES. Prescott e colaboradores identificaram infiltrados inflamatórios em biópsia de pele de pacientes com ES antes mesmo das primeiras evidências de

fibrose tecidual. Estes infiltrados eram compostos principalmente por células T (predominantemente CD4⁺), macrófagos e, em alguns casos, células B (Prescott et al. 1992). Posteriormente, através da análise do receptor de células T (TCR, do inglês, *T-cell receptor*), foi possível observar que as células T presentes no infiltrado tecidual apresentavam um repertório oligoclonal, o que indica uma resposta imune antígeno-específica e expansão clonal *in situ*, reforçando o conceito da participação dessas células na fisiopatologia da doença (Sakkas et al. 2002).

Além disso, as células T CD4⁺ do infiltrado inflamatório e do sangue periférico produzem grandes quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas são capazes de induzir o aumento da produção de colágeno e TGF- β por miofibroblastos *in vivo* e *in vitro* e promover o aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, contribuindo para a manutenção do ambiente inflamatório (Allanore et al. 2015; Baraut et al. 2015; Baraut et al. 2014; Elhai et al. 2019; Katsumoto et al. 2011). As células T CD8⁺ também desempenham papel importante no processo de fibrose. Pacientes com ES apresentam grande quantidade de células T CD8⁺ produtoras de IL-13 na pele, principalmente no período inicial da doença (Fuschiotti et al. 2013; Fuschiotti 2011; Li et al. 2017).

1.3.2 Células T reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) compreendem cerca de 5-15% do total de células T CD4⁺ e participam da manutenção da tolerância imunológica e prevenção de autoimunidade. As Tregs são capazes de suprimir a atividade de células T efectoras através de vários mecanismos, incluindo a produção IL-10 e TGF- β , contato célula-célula e liberação de granzimas e perforinas (Dominguez-Villar and Hafler 2018; Josefowicz et al. 2012).

O primeiro estudo mais aprofundado sobre o papel das Tregs na ES foi publicado por Radstake e colaboradores em 2009. Neste estudo os autores observaram um aumento na frequência de Tregs CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ e diminuição da capacidade supressora dessas células, em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, os trabalhos publicados até o momento apresentam resultados conflitantes a respeito da frequência e número absoluto dessas células em pacientes com ES (Radstake et al. 2009). Klein e colaboradores (2010) observaram uma diminuição da frequência de Tregs CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ no sangue

periférico de pacientes com ES em comparação com indivíduos saudáveis, mas não encontraram diferenças na capacidade funcional dessas células (Klein et al. 2011). Posteriormente, Papp e colaboradores, observaram uma diminuição numérica e da capacidade supressora dessas células nos pacientes com ES. Desse modo, o entendimento do papel de subpopulações de Tregs na ES ainda requer mais estudos (Papp et al. 2011).

1.3.3 Células B efetoras

Nos últimos anos, diversos estudos têm fornecido evidências do envolvimento das células B na fisiopatologia da ES. Sato e colaboradores observaram que células B de pacientes com ES apresentam superexpressão do receptor CD19, em comparação com indivíduos saudáveis (Sato et al. 2000). O CD19 é uma molécula de transdução de sinais presente na superfície das células B e sua superativação diminui os limiares de ativação da célula (Tsuchiya et al. 2004). Além disso, a superativação de células B autorreativas pode levar a um aumento da produção de diversos autoanticorpos, principalmente anti-topoisomerase I (anti-Scl70), anti-centrômero e anti-RNA polimerase III (Sato et al. 2004).

A presença de autoanticorpos é comum em pacientes com ES e constituem importantes marcadores para classificação da doença em ESI ou ESd, e de prognóstico (Kayser and Fritzler 2015). Anticorpos anti-centrômero estão presentes em aproximadamente 70% dos pacientes com ESI conferindo risco aumentado de hipertensão arterial pulmonar (Danieli et al. 2009; Kowal-Bielecka et al. 2017). Os anticorpos anti-topoisomerase I são encontrados em aproximadamente 20% dos pacientes com ESd e estão relacionados com pior prognóstico pelo risco aumentado de fibrose pulmonar (Koenig et al. 2008). Anticorpos anti-RNA polimerase III são detectados em aproximadamente 20% dos pacientes com ESd e correlacionam-se com risco aumentado de crise esclerodérmica renal (PARKER 2008, OKANO 1993).

Além disso, François e colaboradores demonstraram *in vitro* que as células B de pacientes com ES são capazes de induzir a produção de colágeno, IL-6 e TGF- β por fibroblastos. Essa indução é dependente do contato célula-célula e pode ser potencializada pela ação do ativador de células B (BAFF, do inglês, *B-cell activating factor*) (François et al. 2013). Pacientes com ES apresentam altos níveis séricos de BAFF e do ligante indutor de proliferação (APRIL, do inglês, *Proliferation-inducing*

ligand), uma citocina que apresenta estrutura similar ao BAFF, membro também da família do TNF, que desempenha um papel fundamental na homeostase de células B. O aumento dessas citocinas no soro está correlacionado com maior atividade clínica da ES (Matsushita et al. 2006).

1.3.4 Células B reguladoras

As células B reguladoras (Bregs) são fundamentais para a manutenção da homeostase imunológica e autotolerância. Essas células correspondem a aproximadamente 10% do total de células B em indivíduos saudáveis e apresentam fenótipos distintos, incluindo células CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (células B transicionais) e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (células B10) (Blair et al. 2010; Iwata et al. 2011).

O papel imunossupressor das células B foi inicialmente descrito em 1974 por dois estudos independentes. Os autores observaram que os animais que receberam transferência adotiva de esplenócitos depletados de células B foram incapazes de prevenir a reação cutânea de hipersensibilidade tardia induzida (Katz et al. 1974; Neta and Salvin 1974). Em 1996, Wolf e colaboradores observaram que camundongos deficientes de células B são incapazes de se recuperar da encefalomielite autoimune experimental (EAE, do inglês, *Experimental autoimmune encephalomyelitis*), indicando que de alguma forma que subpopulações de células B seriam necessárias para a tolerância e equilíbrio imunológicos (Wolf et al. 1996).

Mizoguchi e colaboradores foram os primeiros pesquisadores que utilizaram o termo “células B reguladoras” para descrever uma subpopulação de células B capaz de suprimir respostas inflamatórias em modelo murino de colite através da produção da citocina IL-10 (Mizoguchi et al. 2002). Posteriormente, Duddy e colaboradores demonstraram pela primeira vez a presença de Bregs produtoras de IL-10 em humanos (Duddy et al. 2007).

Além da capacidade de inibir respostas inflamatórias, as Bregs humanas são capazes de converter células T CD4⁺ efectoras em Tregs CD4⁺Foxp3⁺, predominantemente, mas não exclusivamente, através da secreção de IL-10 (MENON 2016, BORJA 2013, BLAIR 2010). De fato, diversos estudos tem demonstrado que as Bregs conseguem modular respostas imunes em humanos através da produção de TGF-β1, indoleamina 2,3-dioxigenase, adenosina, granzima B e pela expressão do ligante da proteína de morte celular 1 (PD-L1, do inglês,

Programmed death-ligand 1) e do receptor CD1d (Bosma et al. 2012; Flores-Borja et al. 2014; Iwata et al. 2011; Khan et al. 2015; Lindner et al. 2013; Matsushita et al. 2010; Mauri and Blair 2010; Molnarfi et al. 2017; Saze et al. 2013).

Além disso, para serem ativadas e apresentarem funções supressoras, as Bregs requerem o envolvimento, combinação e sinalização de várias moléculas, incluindo o receptor de células B (BCR, do inglês, *B cell receptor*), TLR, CD40, CD80/CD86 e receptores de citocinas (Kulkarni et al. 2018; Menon et al. 2016; Nova-Lamperti et al. 2016; Ticha et al. 2018).

Após estímulo com DNA bacteriano não metilado (CpG, um agonista de TLR-9), células B são induzidas a produzirem anticorpos e grandes quantidades de IL-10 (Bouaziz et al. 2010; Capolunghi et al. 2008; Menon et al. 2016; Yehudai et al. 2012). Além disso, camundongos quiméricos nos quais apenas as células B não possuem TLR2, TLR4 e MyD88 (um adaptador da sinalização via TLR) desenvolvem uma forma de EAE exacerbada devido a produção diminuída de IL-10 (Lampropoulou et al. 2010).

O receptor CD40 foi a primeira molécula co-estimuladora identificada nas células B. A interação CD40-CD40L é necessária para promover regulação positiva das moléculas co-estimuladora CD80/CD86, produção de IL-10, formação de centro germinativo e diferenciação de células B em plasmócitos e em células de memória de vida longa (Flores-Borja et al. 2014; Lafyatis et al. 2009). Nesse contexto, Mauri e colaboradores demonstraram que a transferência adotiva de células B previamente ativadas com anti-CD40 eram capazes de impedir o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno (CIA, do inglês, *Collagen-induced arthritis*) de maneira dependente de IL-10 (Mauri et al. 2003). Posteriormente, foi observado que as Bregs humanas tinham sua capacidade imunossupressora inibida pela adição de anticorpos que bloqueavam as moléculas CD80/86. Portanto, os autores sugeriram que as interações via CD80/86 que acontecem entre as Bregs e as células T CD4⁺ pode atuar sinergicamente na produção de IL-10 pelas Bregs e na supressão das células T CD4⁺ (Blair et al. 2010).

Além disso, alguns estudos indicam que o reconhecimento de antígenos via BCR desempenha um papel importante na ativação das Bregs, promovendo sinais adicionais para ambas as vias de sinalização, CD40-CD40L e TLR. Células B de camundongos transgênicos MD4, cujo o repertório de BCR é monoclonal e específico contra lisozima de ovos de galinha (HEL, do inglês, *Egg-white lysozyme*),

produzem menos IL-10 em resposta à estimulação via TLR-9, em comparação com camundongos selvagens, sugerindo que um repertório policlonal de BCRs seja importante para indução da função imunossupressora das Bregs (Staun-Ram e Miller 2017; Yanaba et al. 2009).

Além disso, camundongos com deleções específicas da molécula de interação estromal 1 (STIM, do inglês, *Stromal interaction molecule 1*) e STIM-2 em células B apresentam menor produção de IL-10 após estímulo com o autoantígeno glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG, do inglês, *Myelin-oligodendrocyte glycoprotein*). As proteínas STIM desempenham um papel crucial no influxo de Ca^{2+} para o citosol após o reconhecimento do antígeno via BCR. Ademais, a transferência adotiva de células B ativadas via BCR protege camundongos diabéticos não-obesos (NOD, do inglês, *Non-obese diabetic mice*) do desenvolvimento da doença e de maneira dependente de IL-10 (Hussain e Delovitch 2007).

Além das vias de sinalização CD40-CD40L, TLR e BCR, outros sinais também foram considerados essenciais para a geração e diferenciação de Bregs (Baba et al. 2015). A citocina BAFF estimula a produção de IL-10 pelas células B via ativador transmembranar e interator de CAML (TACI, do inglês, *transmembrane activator and CAML interactor*) (Yang et al. 2010). O bloqueio de TACI com anticorpos específicos leva a uma redução significativa da secreção de IL-10 por células B $\text{CD}19^+\text{CD}5^+$ de camundongos e de indivíduos saudáveis (Saulep-Easton et al. 2016). Embora o entendimento das vias de sinalização envolvidas na produção de IL-10 por Bregs venha principalmente de modelos murinos, acredita-se que vários desses sinais também ocorrem em humanos.

As células B produtoras de IL-10 exibem um perfil distinto de expressão gênica, apresentando maior expressão de genes imunorreguladores, tais como genes *GARP* (GARP, do inglês, *Glycoprotein A repetitions predominant*), *IL2AR* (receptor alpha de IL-2) e *SOCS3* (supressor 3 da sinalização por citocinas; do inglês, *Suppressor of cytokine signaling 3*) (Van De Veen et al. 2013).

Na última década, diversos estudos demonstraram alterações qualitativas e/ou quantitativas das Bregs em doenças autoimunes. Blair e colaboradores (2010) observaram que pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) possuem a mesma frequência das Bregs $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}$ no sangue periférico comparados com indivíduos saudáveis, porém, a capacidade imunossupressora dessas células está reduzida.

Posteriormente, Borja e colaboradores observaram que a frequência de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} na artrite reumatoide (AR) varia de acordo com a atividade da doença, sendo encontrada em menor frequência em pacientes com doença ativa, quando comparados a indivíduos saudáveis e pacientes com a forma inativa da doença (Flores-Borja et al. 2013). Além disso, Barsotti e colaboradores demonstraram diminuição na frequência e na capacidade supressora de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes com imunodeficiência comum variada, em comparação com indivíduos saudáveis (Barsotti et al. 2016). Os resultados supracitados sugerem que alterações qualitativas e/ou quantitativas de subpopulações de Bregs podem ter implicações na patogênese e/ou no prognóstico de pacientes com doenças autoimunes.

Atualmente, há apenas cinco trabalhos na literatura que avaliaram Bregs em pacientes com ES. Nesses estudos foram observados que as Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ de pacientes em ES apresentam capacidade supressora diminuída. Além disso, a diminuição da frequência e do número absoluto dessas células no sangue periférico está associada com um maior acometimento da pele. Os autores também observaram que pacientes com ES apresentam defeito na fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK, do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinases*), da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3, do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 3*) e da proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2, do inglês, *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*), que constituem vias de sinalização fundamentais para a produção de IL-10 pelas Bregs após estímulos via BCR e TLR9 (Aravena et al. 2017; Arruda et al. 2018b; Matsushita et al. 2016; Mavropoulos et al. 2017; Mavropoulos et al. 2016).

Figura 1. Mecanismos imunomoduladores de células B reguladoras humanas. Bregs podem suprimir a diferenciação de Th1, Th17 e cT_{FH}, proliferação de células CD4⁺ T, CD8⁺ T e T_{FH}, produção de TNF- α por monócitos. Os Bregs mantêm a expressão do FoxP3⁺ nas nTreg e promovem a diferenciação de células T efectoras em iTreg. Bregs também suportam a manutenção de células iNKT. As abreviações são as seguintes: Bregs, células B reguladoras; AMP, monofosfato de adenosina; FoxP3, forkhead Box P3; cT_{FH}, célula auxiliar folicular T circulante; GZMB, Granzima B; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenase; iTreg, célula T reguladora induzida; IFN- γ , interferon gama; IL-10, interleucina-10; IL-17, interleucina-17; iNKT, célula T natural killer invariante, PD-L1, Programmed death-ligand 1; Th, T *helper* T; TGF- β 1, fator de crescimento transformador beta 1; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa.

1.4 Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas para ES

As modalidades terapêuticas convencionais disponíveis atualmente para o tratamento de ES são baseadas na extensão e gravidade das lesões, exigindo principalmente estratégias órgão-específicas (SIERRA-SEPULVEDA 2019, DENTON 2017). Para a vasculopatia crônica, são utilizadas medicações vasodilatadoras aliadas a fármacos anti-inflamatórios (hormonais ou não), e/ou inibidores da bomba protônica quando há acometimento do trato gastrointestinal. Em casos mais graves, com extenso envolvimento cutâneo e pulmonar de rápida progressão, são prescritos

pulsos mensais de ciclofosfamida, os quais demonstram resultados variáveis (Kowal-Bielecka et al. 2017).

Além disso, nos últimos anos o tratamento com rituximab tem se mostrado eficaz principalmente em pacientes com ES acometidos por doença pulmonar intersticial (Elhai et al. 2018; Thiebaut et al. 2018). O rituximab é um anticorpo monoclonal quimérico capaz de reconhecer a molécula CD20 que é expressa na membrana da maioria das células B (com exceção dos plasmócitos) e de promover a lise celular (Weiner 2010).

No entanto, todos esses tratamentos são incapazes de reestabelecer a autotolerância imunológica e de impedir a progressão da doença por longos períodos, sendo capazes apenas de minimizar os efeitos de lesões teciduais já estabelecidas. Nesse contexto, o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) emergiu como uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento de ES. O TACTH é o único tratamento capaz de promover remissão clínica de longo prazo, livre de sintomas e sem a necessidade do uso de tratamentos adjuvantes (Burt et al. 2011; van Laar et al. 2014; Snowden et al. 2018; Snowden et al. 2012).

A iniciativa de se utilizar o TACTH no tratamento de doenças autoimunes surgiu a partir de observações de casos de pacientes que eram acometidos concomitantemente por neoplasia hematológica e doença autoimune, e apresentavam remissão clínica prolongada de ambas as doenças após serem submetidos ao transplante de medula óssea (Swart et al. 2017). Além disso, evidências da eficácia terapêutica do TACTH foram obtidas em modelos murinos de doenças autoimunes. Van Bakkum e colaboradores demonstraram que a erradicação prévia do tecido medular utilizando radiação e ciclosporina em altas doses, seguido da infusão de células tronco hematopoiéticas (CTHs) singênicas, promovia remissão da doença em modelos murinos de CIA e EAE (Van Bakkum 2000; Van Bakkum et al. 1989).

Atualmente, o TACTH pode ser dividido em quatro etapas principais, de acordo com as diretrizes da Sociedade Europeia de Transplante de Medula Óssea (Snowden et al. 2018; Snowden et al. 2012). Inicialmente, as CTHs (CD34⁺) são recrutadas da medula óssea para o sangue periférico através de um processo chamado mobilização. Este procedimento consiste na administração de baixas doses de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do

inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*). Após a mobilização, as CTHs do sangue periférico são colhidas por leucaférese (com ou sem seleção *ex vivo* de CD34⁺) e criopreservadas. Subsequentemente, são administradas drogas imunossupressoras em altas doses, tais como, globulina anti-timocitária (ATG, do inglês, *Anti-thymocyte globulin*), ciclofosfamida ou fludarabina, que promovem intensa ablação imunológica. Este passo é denominado regime de condicionamento. Por fim, no dia do transplante, as CTHs autólogas previamente colhidas são reinfundidas no paciente para promover a recuperação da hematopoiese e a reconstituição imunológica (Muraro et al. 2017; Swart et al. 2017). As etapas do TACTH estão sumarizadas na **Figura 2**.

Em 1997, Tyndall e colaboradores publicaram o primeiro relato de tratamento de ES com TACTH. Uma mulher de 37 anos, cinco anos após o aparecimento do fenômeno de Raynoud, que apresentava grave acometimento pulmonar e de pele, foi submetida ao regime de condicionamento com ciclofosfamida (200 mg/kg) seguido pelo transplante de CTHs autólogas. Seis meses após o TACTH, foi possível observar expressiva melhora da pele e do acometimento pulmonar e redução dos níveis séricos de anti-Sc170 (Tyndall et al. 2001).

Figura 2. Sequência esquemática do TACTH. O procedimento começa com (1) a mobilização de CTHs da medula óssea para o sangue periférico através da administração de baixas doses de ciclofosfamida e G-CSF. (2) As CTHs são então colhidas por aférese, com ou sem manipulação ex vivo (seleção de CD34 + HSCs), e (3) criopreservadas. (4) Antes do transplante, o sistema imunológico é depletado pela alta dose de imunossupressores (regime de condicionamento), seguido pela (5) reinfusão de CTHs autólogas. Abreviações: Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH); Células-tronco hematopoiéticas (CTHs); fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Modificado de Lima-júnior et al. 2019, *Thymus Rejuvenation After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Autoimmune Diseases*. Capítulo para o Livro: *Thymus Transcriptome and Cell Biology* (2019).

Em um outro estudo de caso, uma paciente de 12 anos, oito anos após o aparecimento do fenômeno de Raynaud, que apresentava pneumonia grave e progressiva, foi submetida ao TACTH com seleção de CTHs CD34⁺ e regime de condicionamento com ciclofosfamida (200 mg/kg) associada a alemtuzumab (anti-CD52, 20 mg/Kg). Dois anos após o transplante a paciente apresentava melhora significativa do quadro pulmonar e do escore de pele, além de tornar-se independente do uso de corticoesteroides. No entanto, os níveis séricos de anti-Sc170 permaneceram inalterados (MARTINI 1999). É importante destacar que, até o momento, não há evidências de que a seleção de CTHs CD34⁺ represente benefícios significantes ao desfecho clínico dos pacientes com ES após o TACTH. No entanto, esses achados devem ser confirmados por estudos prospectivos randomizados (Oliveira et al. 2016).

O registro europeu de transplante de medula óssea (registro da EBMT, do inglês, *European Society for Blood and Marrow Transplantation registry*) publicou uma avaliação retrospectiva de 900 pacientes com diversas doenças autoimunes (sendo 175 com ES) que foram submetidos ao TACTH entre 1996 e 2007. O estudo mostrou que o TACTH induziu remissão clínica nos pacientes por mais de 5 anos, com sobrevida global de 85% e sobrevida livre de progressão da doença em 43% dos pacientes, demonstrando que o TACTH é uma alternativa terapêutica eficaz e segura para pacientes com doenças autoimunes (Farge et al. 2010). A atualização mais recente do EBMT mostrou que 433 pacientes com ES já foram transplantados, sendo a segunda patologia mais transplantada, atrás apenas da esclerose múltipla (EM) (Kelsey et al. 2016).

A taxa de mortalidade relacionada ao TACTH, que no final da década de 1990 era de aproximadamente 10%, nos dias atuais é em torno de 2,5%, devido a seleção mais criteriosa dos pacientes com ES. Atualmente, os critérios de inclusão e exclusão constituem: doença cutânea difusa e/ou envolvimento pulmonar intersticial que esteja progredindo nos últimos 6 meses, mesmo que o paciente esteja fazendo uso de medicamentos imunossupressores. A progressão do envolvimento cutâneo é definida por um aumento maior que 25% no escore de Rodnan modificado (mRss) nos últimos 6 meses. O envolvimento pulmonar, por sua vez, é definido por uma diminuição da capacidade vital forçada ou difusão de monóxido de carbono maior que 10% em 6 meses (Snowden et al. 2012).

Com base nos resultados favoráveis dos estudos clínicos de fase I/II, estudos randomizados e multicêntricos foram iniciados mundialmente. O maior estudo de fase III já realizado, *Autologous Stem Cell Transplantation International Scleroderma Trial*, randomizou 156 pacientes com ES provenientes de 10 centros europeus que foram tratados com TACTH (n=79) ou pulso mensal de ciclofosfamida (n=77) e que receberam acompanhamento médico por 10 anos (mediana de 5,8 anos). Os autores do estudo observaram que os pacientes transplantados apresentaram maior taxa de sobrevida em comparação aos pacientes não transplantados (van Laar et al. 2014).

Posteriormente, Del Papa e colaboradores publicaram um estudo retrospectivo avaliando a eficácia do TACTH em 18 pacientes com ES que apresentavam progressão rápida da doença e compararam com os resultados de 36 pacientes tratados com terapia convencional a base de ciclofosfamida, metotrexato,

azatioprina ou prednisona. Os autores demonstraram que o TACTH foi eficaz para redução da taxa de mortalidade relacionada à doença em pacientes com ES de progressão rápida, uma vez que ocorreu apenas um óbito 34 meses pós-transplante. Em contraste, a taxa de mortalidade no grupo controle ao final de todo seguimento foi de 61%. Além disso, os pacientes submetidos ao TACTH apresentaram melhora significativa do mRss e da capacidade de difusão pulmonar 12 meses após o transplante quando comparados ao grupo controle, sendo que estes resultados se mantiveram por 5 anos (Del Papa et al. 2016).

Recentemente, um outro estudo randomizado intitulado “*Scleroderma: Cyclophosphamide or Transplantation (SCOT)*” comparou 39 pacientes tratados com ciclofosfamida com 36 pacientes tratados com TACTH. Após 6 anos de seguimento clínico, os autores observaram que os pacientes tratados com TACTH apresentaram uma menor progressão da doença em comparação aos pacientes tratados com ciclofosfamida (O’Sullivan et al. 2018).

Nosso estudo clínico de TACTH para o tratamento de ES é desenvolvido na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Desde 2003, cento e nove pacientes já foram transplantados para tratar ES e encontram-se atualmente em seguimento clínico-laboratorial e monitoramento imunológico. A maioria dos pacientes transplantados apresentou resposta clínica favorável, com melhora do espessamento cutâneo e estabilização da função pulmonar.

1.4.1 Mecanismos imunológicos do TACTH

O racional do uso do TACTH no tratamento de doenças autoimunes é que a imunossupressão intensa elimina o repertório de células B e T autorreativas pré-existentes e reconstitui um novo sistema imunológico a partir do enxerto de CTHs autólogas, reestabelecendo a tolerância imunológica os pacientes. Esse mecanismo foi denominado “*reset imunológico*” (Abrahamsson and Muraro 2008; Muraro et al. 2014; Muraro et al. 2005). Os mecanismos imunológicos envolvidos no TACTH, que foram descritos até o momento, estão sumarizados na **Figura 3**.

O aparecimento de granulócitos, monócitos, células dendríticas e células natural killer (NK) no sangue periférico acontece cerca de 2 a 3 semanas após o

TACTH e marca o início da reconstituição da imunidade inata. O uso de G-CSF ou do fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) aceleram o processo de reconstituição hematopoiética (Arruda et al. 2016a; Muraro et al. 2017; Swart et al. 2017).

Em contraste, a reconstituição de células da imunidade adaptativa é um processo lento, que se reflete num repertório imunológico restrito e prolongada depleção de células T naïve na periferia. Após o TACTH, a reconstituição das células T CD8⁺ demora em torno de 6 meses devido à grande propensão dessas células a sofrerem proliferação homeostática induzida pelo ambiente linfopênico (Alexander et al. 2018; Brink et al. 2015; Lutter et al. 2018).

Figure 3. Reconstituição imunológica após TACTH. A imunossupressão em altas doses leva a uma imunoablação intensa do sistema linfóide do paciente (incluindo as células B e T autorreativas), abrindo espaço para repopulação celular. No momento do transplante, as CTHs autólogas são reinfundidas e migram para a medula óssea, onde dão origem a precursores mielóides e linfóides. Logo após o TACTH, os neutrófilos, monócitos e eosinófilos reconstituem-se rapidamente, assim como as células dendríticas, células NK e células B que se desenvolvem completamente na medula óssea. Os precursores linfocíticos migram para o timo, onde dão origem novas células T. A linfopenia aguda após o transplante desencadeia mecanismos que induzem a proliferação homeostática de linfócitos maduros que sobreviveram ao regime de condicionamento ou reinfundidos junto com o enxerto de CTHs. Nesse período inicial, a reconstituição das células T é timo-independente e ocorrem expansões oligoclonais de células T de memória e memória-efetoras (repertório TCR restrito). Nesse período ocorre também expansões de células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ induzidas e de células T supressoras CD8⁺CD28⁻ por mecanismos de proliferação homeostática. A produção de células T naïve (incluindo células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ naturais) pelo timo inicia-se aproximadamente 1 ano pós-transplante, dependendo da idade do paciente, determina a diversificação e renovação das especificidades do repertório de células T a longo prazo (2-4 anos pós-TACTH). Com o tempo, a produção de células T naïve aumenta enquanto a expansão homeostática periférica das células T diminui. Abreviações: Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH). Modificado de Arruda et al. 2017, *Hematopoietic Stem Cell Therapy in Autoimmune Diseases*. Capítulo para o Livro: *Current concepts and controversies in HSCT*. (2014).

No entanto, apesar da proliferação homeostática ser capaz de restaurar níveis basais de linfócitos totais, ela está associada a uma diversidade reduzida das células T nos primeiros 6-12 meses pós-TACTH. Além disso, a reconstituição de células T CD4⁺ requer entre 12 a 36 meses para normalização do repertório na periferia por serem mais dependentes da reativação tímica e subsequente exportação de células recém-emigrantes do timo (Abrahamsson and Muraro 2008; Muraro et al. 2014; Muraro et al. 2005)

O regime de condicionamento ablativo elimina as células B em quase todos os estágios de diferenciação, exceto os plasmócitos de vida longa. A reconstituição de células B, por sua vez, ocorre entre 2 e 12 meses após o TACTH (ALEXANDER 2018, LUTTER 2018). Em pacientes com LES, o TACTH reduziu os níveis de anticorpos anti-DNA, induziu a recuperação do número absoluto de células B e normalizou o compartimento de células B (Alexander et al. 2009). Muraro e colaboradores demonstraram a persistência de bandas oligoclonais no sistema nervoso central de pacientes com EM houve após o TACTH, sugerindo que células produtoras de imunoglobulinas no compartimento do foram insuficientemente depletadas pela imunossupressão em altas doses (Muraro et al. 2014). Nos pacientes com ES, houve um aumento do número de células B de memória nos períodos iniciais pós-transplante como consequência da proliferação homeostática, seguido por um declínio do número dessa subpopulação e aumento do número de células B naïve recém-produzidas na medula óssea (Arruda et al. 2018b; Farge et al. 2005).

Em 2005, Muraro e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a remissão clínica observada em pacientes com EM após o TACTH é decorrente de mudanças qualitativas profundas no sistema imunológico, caracterizadas pela renovação do repertório de células T nesses pacientes (Muraro et al. 2005). Dois anos após o TACTH, os pacientes apresentaram maior diversidade de TCRs e com extensa renovação das especificidades clonais comparadas com o período pré-transplante, devido à produção de novas células T naïve pelo timo.

Posteriormente, foi observado que a remissão clínica em pacientes com LES era resultado da eliminação de células de memória autorreativas, refletida na intensa diminuição dos níveis de autoanticorpos anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA) e pelo aumento significativo do número de células T naïve recém-imigrantes do timo CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺ na periferia (Alexander et al. 2009).

No entanto, não está claro se as células B e T de memória são completamente removidas do sistema hematopoiético e de órgãos-alvo, independente do regime de condicionamento empregado. Assim, a imunoablação incompleta ou até mesmo a reinfusão de células T e/ou de memória autorreativas presentes no enxerto das CTHs autólogas podem ser responsáveis pela reativação da doença observada em um terço dos pacientes com doenças autoimunes transplantados (Farge et al. 2010; Sullivan et al. 2010).

Justificativa e hipótese

2. Justificativa e hipótese

O estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no TACTH para ES é essencial, uma vez que os tratamentos atuais disponíveis são insatisfatórios e pouco eficazes no controle da doença, principalmente em pacientes com rápida progressão do acometimento da pele e órgãos internos. Atualmente, o TACTH constitui uma alternativa terapêutica promissora para a ES, impedindo a progressão da doença e/ou favorecendo o uso da terapêutica convencional em pacientes refratários (Alexander et al. 2018; Malmegrim et al. 2018; Snowden et al. 2018).

No entanto, existem ainda inúmeras questões sobre mecanismos celulares e moleculares do TACTH em pacientes com doenças autoimunes a serem respondidas. Dessa forma, a avaliação qualitativa do novo sistema imunológico reconstituído pelas CTHs autólogas, por exemplo, da capacidade funcional das células reguladoras reconstituídas/geradas após o transplante, é fundamental para melhorarmos futuramente os protocolos do TACTH para doenças autoimunes.

Os efeitos do TACTH no compartimento de células B e na resposta imune humoral foram menos estudados em relação as células T (Malmegrim et al. 2018).

O projeto de pesquisa que resultou nessa tese de doutorado foi uma continuidade dos estudos que vêm sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa desde 2003 sobre os mecanismos imunológicos envolvidos no TACTH em pacientes doenças autoimunes. Até o momento, nossos achados contribuíram para a identificação de biomarcadores de resposta terapêutica envolvidos nesse tipo de terapia celular em pacientes com diabetes tipo 1, esclerose múltipla e esclerose sistêmica (Malmegrim et al. 2018). Nos pacientes com ES, a reativação das funções tímica e medular é crucial para a eficácia terapêutica do TACTH. Pacientes com ES respondedores apresentam maiores números de Tregs e de Bregs, além de uma menor sobreposição do repertório de TCRs pre-/pós-TACTH do que pacientes que não responderam ao tratamento (Arruda et al. 2018b).

Com base nesses dados anteriores, propusemo-nos a avaliar detalhadamente a reconstituição quantitativa e qualitativa das subpopulações de células B nos pacientes com ES, incluindo também períodos mais precoces após o transplante. Nossa hipótese é que os pacientes com ES apresentam, logo após o transplante, uma diminuição dos números de células B de memória e um aumento do número e

função de subpopulações de células B reguladoras, levando à involução do acometimento fibrótico cutâneo e melhora clínica dos pacientes após o TACTH.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o imunofenótipo, expressão gênica e função de subpopulações de células B reconstituídas em pacientes com esclerose sistêmica tratados com transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar nos pacientes com esclerose sistêmica, antes e sequencialmente após o transplante:

- O imunofenótipo das subpopulações de células B periféricas;
- A produção de IL-6 e TGF- β por células B efectoras;
- A produção de IL-10 por células B reguladoras;
- A expressão de diversos genes envolvidos em processos inflamatórios em células mononucleares do sangue periférico;
- A concentração plasmática de BAFF e APRIL.

Realizar a correlação entre os parâmetros imunológicos e laboratoriais com a resposta clínica dos pacientes esclerose sistêmica tratados pelo transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas.

Delineamento experimental

4. Delineamento experimental

Amostras de sangue periférico dos pacientes com ES submetidos ao TACTH foram colhidas antes e em cinco períodos (30, 60, 120, 180, 360 dias) após o tratamento. Foram colhidos antes do transplante e nos períodos de 180 e 360 dias após o transplante, 40 mL de sangue periférico em tubos com EDTA (para o isolamento de células mononucleares e posterior extração de DNA e RNA, realização de ensaios de produção de citocinas por células B e de proliferação de células T *in vitro*), 5 mL de sangue periférico em tubos com heparina (para realização de imunofenotipagem a fresco por citometria de fluxo) e 5 mL em tubo sem anticoagulante para separação de soro (para dosagem de citocinas).

Nos períodos de 30, 60 e 120 dias após o transplante foram colhidos 5 mL de sangue periférico em tubos com heparina para realização de imunofenotipagem a fresco por citometria de fluxo e 5 mL em tubos sem anticoagulante para a separação de soro. Além disso, nos períodos de 60 e 120 dias após o transplante foram colhidos 10 mL de sangue periférico em tubos com EDTA, para o isolamento de células mononucleares.

Foram feitas as seguintes avaliações antes e até 360 dias após o transplante: determinação da porcentagem e do número absoluto das células B; análise da expressão diferencial de genes envolvidos com a resposta inflamatória; quantificação dos níveis séricos das citocinas BAFF e APRIL.

Inicialmente, foi feita uma análise global com todos os pacientes transplantados, independente da resposta clínica ao tratamento, comparando o período pré-TACTH com todos os períodos pós-TACTH. Posteriormente, os pacientes foram retrospectivamente divididos em dois grupos, sendo classificados como "respondedores" e "reativados", de acordo com a resposta clínica ao tratamento.

Casuística, materiais e métodos

5. Casuística, materiais e métodos

5.1 Pacientes com esclerose sistêmica

Foram estudados 24 pacientes com esclerose sistêmica (ES) grave, refratária ao tratamento convencional, submetidos ao tratamento com transplante autólogo com células tronco hematopoiéticas (TACTH) na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (HC-FMRP-USP). O protocolo de transplante específico para a ES, aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMRP-USP (9035/2001) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (3713/2001), descreve detalhadamente o plano de tratamento (critérios de inclusão e exclusão na seleção dos pacientes, esquema de mobilização e colheita das células-tronco hematopoiéticas autólogas, regimes de condicionamento seguido pelo TACTH, bem como o tratamento de suporte e monitorização clínico-laboratorial) e encontra-se já em andamento na Unidade de TMO desde 2003. A colheita de amostras de sangue periférico para monitoramento imunológico realizado nesse trabalho foi também aprovada pelo Comitês de Ética do HC-FMRP-USP (9035/2001) e da FCFR-USP (3.115.796).

5.2 Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas

O TACTH foi dividido em cinco etapas: 1) mobilização das células-tronco hematopoiéticas (CTHs) a partir da medula óssea para o sangue periférico; 2) leucaférese e criopreservação das CTHs; 3) regime de condicionamento, que consiste em administração de altas doses de imunossupressores para promover imunoblacção; 4) transplante/infusão das CTHs autólogas; 5) seguimento clínico-laboratorial e monitoramento imunológico dos pacientes nos períodos pós-TACTH.

5.2.1 Mobilização das células-tronco hematopoiéticas

Para a mobilização de CTHs a partir da medula óssea para o sangue periférico foram utilizados ciclofosfamida e fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating fator*). A ciclofosfamida de ciclofosfamida (2 g/m²) foi aplicada em duas doses (1g/m² por dose) durante 1 hora, com intervalo de 12 horas entre as aplicações. O G-CSF (10 µg/Kg/dia) foi

administrado por via subcutânea no primeiro dia após a aplicação de ciclofosfamida, até o término da leucoaférese. O início da colheita das CTHs 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 leucoaférese foi realizada uma ou duas vezes para atingir o valor mínimo de $3,0 \times 10^6$ CD34⁺/Kg do paciente. Após a colheita, as CTHs autólogas foram criopreservadas em 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do transplante.

5.2.2 Regime de condicionamento

O regime de condicionamento foi constituído pela administração em altas doses de ciclofosfamida e globulina anti-timocitária (ATG, do inglês *Anti-thymocyte globulin*) para depleção *in vivo* das células do sistema imunológico. A ciclofosfamida foi administrada por via intravenosa em quatro doses de 50mg/Kg/dia, durante 1 hora, nos dias -5, -4, -3, -2 que antecederam a infusão das CTHs. A ATG foi administrada em doses de 0,5mg/Kg/dia no dia -5 e doses de 1mg/Kg/dia nos dias -4, -3, -2 e -1 que antecederam a infusão das CTHs.

5.2.3 Infusão de células-tronco hematopoiéticas

As CTHs foram infundidas no dia 0 (zero), data do transplante propriamente dito. Doses de G-CSF (5µg/Kg/dia) foram administradas por via subcutânea no dia +5 pós-transplante e nos dias subsequentes, até que a contagem de neutrófilos atingisse o valor >1000/mm³.

A enxertia medular 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.

5.2.4 Seguimento dos pacientes após o transplante

Após o transplante os pacientes permaneceram internados na Unidade de TMO do HCFMRP-USP até a enxertia medular e em seguimento ambulatorial

intensivo até aproximadamente 60 dias após o transplante. Após este período os pacientes receberam alta hospitalar e, posteriormente, retornaram em consultas periódicas de acompanhamento no ambulatório da unidade de TMO do HCFMRP-USP. Após o transplante, as amostras de sangue periférico foram colhidas de acordo com os retornos dos pacientes ao hospital, portanto, nem sempre as datas das colheitas coincidiram exatamente com as datas programadas citadas anteriormente. Além disso, alguns pacientes não possuem amostras colhidas de todos os períodos devido principalmente ao estado clínico, difícil acesso venoso ou não comparecimento dos aos retornos determinados.

5.3 Avaliação do escore de Rodman, dos níveis de autoanticorpo, e da proteína C reativa

Os pacientes foram avaliados clinicamente pela medida do acometimento cutâneo através do escore de Rodnan modificado (mRSS, do inglês, *Modified Rodnan Skin Score*) no período pré-transplante, 180 e 360 dias após o TACTH, durante os retornos previamente agendados. O mRSS avalia o espessamento cutâneo por meio da palpação de 17 áreas do corpo, usando uma escala de 0-3 onde, 0 = normal, 1 = espessamento leve, 2 = espessamento moderado e 3 = espessamento intenso. As pontuações do mRSS podem variar de 0 (pele normal) a 51 (espessamento cutâneo nas 17 áreas avaliadas). Além disso, foram realizados testes laboratoriais para a dosagem sérica de proteína C reativa (PCR) e do antianticorpo anti-scl70 nos períodos supracitados.

5.4 Imunofenotipagem das subpopulações de células B no sangue periférico

Foram colhidas amostras de sangue periférico (na presença de EDTA) dos pacientes pré- e pós-TACTH para realização do hemograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo a fresco. O hemograma foi realizado em contador de células automático (Coulter, Beckman Coulter Inc., Miami, USA) para a obtenção do número absoluto de linfócitos.

Para realização da imunofenotipagem, alíquotas de 150 µL de sangue total a fresco foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz, com 5 µL de anticorpos monoclonais ou isotipos controles conjugados aos

fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Peridinin chlorophyll Protein (PercP), ficoeritrina-CY5 (PE-CY5) ou alofococianina (APC) adquiridos da Becton-Dickinson (San Diego, CA, USA) ou Pharmingen (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) previamente titulados, para marcação dos antígenos de membrana. 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 temperatura ambiente, para fixação das células e lise dos eritrócitos. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 3 minutos a 500g, lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS, 0.2% de soro bovino fetal, 0.02% de azida sódica), ressuspensas em 150 µL de tampão FACS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: CD19-FITC (clone HIB19), CD24-PE (clone ML5), CD38-APC (clone HIT2), CD27-PE (clone M-T271), CD27- PerCP-CY5 (clone M-T271), IgD-PE (clone IA6-2), CD20-FITC (clone 2H7), CD43-PE (clone 1G10), CD69-APC (clone FN 50), PD1-PE (clone MIH4). Controles isotípicos IgG1-FITC (clone MOPC-21), IgG2a-PE (clone MOPC-21), IgG1-Percp (clone MOPC-21), IgG1-APC (clone MOPC-21) foram incluídos em todos os experimentos para detecção de reações inespecíficas.

Após as marcações, as seguintes subpopulações de células B foram caracterizadas: CD19⁺IgD⁺CD27⁻ (naïve), CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (memória sem troca de classe), CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (memória com troca de classe), CD19⁺IgD⁻CD27^{hi} (plasmócito), CD19⁺IgD⁻CD27⁻ (memória duplo negativa), CD19⁺CD38⁻IgD⁺ (Bm1, naïve virgem), CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2, naïve ativada), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁺ (Bm2', pré centro germinativo), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁻ (Bm3+4, centroblasto + centrócito), CD19⁺CD38⁺IgD⁻ (*early* Bm5, memória recente) e CD19⁺CD38⁻IgD⁻ (*late* Bm5, memória tardia), CD19⁺PD1⁺, CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻ (célula B do tipo B1), CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (célula B reguladora transicional), CD19⁺CD24^{hi}CD38⁻, CD19⁺CD24⁻CD38^{hi}, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (B10).

Os resultados referentes a imunofenotipagem foram expressos em porcentagem e em valores absolutos. A contagem absoluta foi obtida multiplicando-se o valor da porcentagem obtida pelo número de linfócitos/µL (determinado pelo hemograma). Por fim, a expressão de determinados marcadores foi avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, *Median fluorescence*

intensity). As estratégias de *gating* de todas as subpopulações de células B são demonstradas nos **Apêndices 1 – 3**.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês, *Peripheral blood mononuclear cells*) dos pacientes foram colhidas na presença de heparina e isoladas pelo método de centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll-Paque™ Plus (d=1,077; GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia). Após a colheita, as amostras de sangue foram diluídas em tampão fosfato-salina (1X PBS) aplicadas sobre o gradiente e centrifugadas a 500g por 30 minutos a temperatura ambiente para a obtenção das PBMCs. Após a centrifugação, as células foram cuidadosamente colhidas e lavadas duas vezes em 1X PBS. Após as lavagens, 10µl da suspensão celular foi diluída em 490µl de corante de Türk para contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 200g por 10 minutos a temperatura ambiente para a retirada do sobrenadante. Por fim, 1×10^7 /mL de células isoladas foram congeladas em uma solução contendo soro bovino fetal (Hyclone, Logan, USA) e 10% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido para serem utilizadas posteriormente nos ensaios funcionais. Paralelamente, 1×10^7 células foram lisadas e armazenadas em Trizol Reagent™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a -80°C para extração de RNA.

5.5 Congelamento de soro

Amostras de 5mL de sangue periférico foram colhidas na presença de EDTA e em tubo sem anticoagulante, para obtenção de plasma e soro respectivamente, em seguida, foram centrifugadas a 300g, a temperatura ambiente por 10 minutos. Após separação da fase líquida e sólida do sangue, 1 mL do soro e do plasma foram fracionados e armazenados em freezer -80°C em 4 alíquotas de 250µL para posterior dosagem sérica de citocinas e de autoanticorpos.

5.6 Avaliação da produção de citocinas por Bregs e células B efetoras

Os ensaios de produção de IL-10, IL-6 e TGF-β1 por células B foram realizados em amostras de PBMCs. Após descongelamento, as PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado (10% de soro fetal bovino inativado, 1% de Hepes, piruvato de sódio, 1% penicilina-streptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol) e plaqueadas

na concentração de 1×10^6 células/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “U”. O estímulo para avaliação da produção de citocinas por células B constitui-se de CpG (ODN 2006, 10 mg/mL, Invivogen) acompanhado ou não de estimulação com *human recombinant sCD40L* (1 mg/mL, R&D Systems) durante 48 horas, seguindo protocolo já publicado por Iwata e colaboradores (2011). Nas últimas 6 horas de cultura, adicionou-se PMA (50 ng/mL; Sigma Aldrich) e ionomicina (1 mg/mL; BD Bioscience, Sigma Aldrich) na presença de brefeldina A (10mg/mL; Sigma Aldrich). Os cultivos foram feitos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com a solução tampão FACS Buffer (BD) e marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD19 APC (clone HIB19), anti-CD24 FITC (Clone ML5), anti-CD27 PerCP-CY5 (clone M-T271), anti-CD38 PE-Cy™7 (Clone HIT2) por 15 minutos, ao abrigo da luz. A viabilidade celular foi avaliada por BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences, USA). Para determinação da produção das citocinas intracelulares as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, USA), em seguida foram lavadas utilizando a solução tampão Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences, USA) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-IL10 PE (Clone JES3-19F1), anti-IL6 PE (Clone MQ2-6A3), anti-TGF-β1 PE (Clone TW4-9E7) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após marcação, a aquisição das células foi feita no aparelho de citometria de fluxo LSR Fortessa (BD, USA) e a análise no software FlowJo (Tree Star®). Exemplos das estratégias de *gating* utilizadas na análise estão mostradas no **Apêndice 4**.

5.7 Avaliação da fosforilação de proteínas intracelulares em células B

O ensaio de fosforilação das proteínas intracelulares STAT3, ERK1/2 e p38MAPK em células B foi realizado em PBMCs utilizando a técnica phosflow. Após descongelamento, as PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado (10% de soro fetal bovino inativado, 1% de Hepes, piruvato de sódio, 1% penicilina-streptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol) e plaqueadas em concentração de 1×10^6 células/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “U”. O estímulo para avaliação da fosforilação das proteínas por células B constitui-se de CpG (ODN 2006, 10 mg/mL, Invivogen) durante 30 minutos, seguindo protocolo já publicado por Masson e colaboradores

(2015). Os cultivos foram feitos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com a solução tampão FACS Buffer (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD19 APC (clone HIB19) por 15 minutos, ao abrigo da luz. Para determinação da fosforilação das proteínas intracelulares as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences), em seguida foram lavadas utilizando a solução tampão Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-pSTAT3 PE (Clone 4/P-STAT3), anti-pERK1/2 alexa 647 (Clone 20A), anti-pp38MAPK (Clone 36/p38) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após marcação, a aquisição das células foi feita no aparelho de citometria de fluxo LSR Fortessa (BD, USA) e a análise no software FlowJo (Tree Star®). Por fim, a expressão dos marcadores foi avaliada por MFI. Exemplos das estratégias de *gating* utilizadas na análise estão disponíveis no **Apêndice 5**.

5.8 Avaliação da proliferação e de produção de citocinas por células T efectoras

O ensaio de proliferação e de produção de IFN- γ e TNF- α por células T efectoras foram realizadas em PBMCs totais ou depletadas (por *cell sorting*) de Bregs do fenótipo CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. Após descongelamento, as PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de tampão Hepes, piruvato de sódio, 1% penicilina-streptomicina, L-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol e aliquotadas em concentração de 1x10⁶ células/mL por poço, em placa de 96 poços de fundo “U”. A estimulação das células T foi feita com anti-CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), na proporção de 1:1 durante 72 horas. Nas últimas 6 horas de cultura, adicionou-se PMA (50 ng/mL; Sigma Aldrich) e ionomicina (1 mg/mL; Sigma Aldrich) na presença de brefeldina A (10mg/mL; Sigma Aldrich). Os cultivos foram feitos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com a solução tampão FACS Buffer (BD) e marcadas com os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD4 FITC (clone RPA-T4), por 15 minutos, ao abrigo da luz. A viabilidade celular foi avaliada por BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences). Para determinação da produção das citocinas intracelulares e proliferação celular, as células foram fixadas e permeabilizadas

utilizando o kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences), em seguida foram lavadas utilizando a solução tampão Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-IFN- γ PE (Clone JES3-19F1), anti-TNF- α alexa 488 (Clone MAb11), anti-Ki67 (Clone B56) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após marcação, a aquisição das células foi feita no aparelho de citometria de fluxo LSR Fortessa (BD, USA) e a análise no software FlowJo (Tree Star®). As estratégias de *gating* utilizadas na análise estão disponíveis nos **Apêndice 6 – 7**.

5.9 Extração de RNA a partir de células mononucleares do sangue periférico

A extração do RNA foi realizada utilizando o kit comercial *miRNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA). As PBMCs armazenadas em Trizol Reagent™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) foram incubadas por 5 minutos a TA, 140 μ L de clorofórmio 36 foram adicionados à solução de células, a qual foi incubada por 3 minutos e centrifugada por 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase transparente (contendo o RNA) foi coletada e transferida para outro tubo *RNase-free*, onde foi adicionado 1,5x do volume da fase contendo o RNA de etanol 100%. Essa solução contendo o RNA foi transferida para uma *Spin Cartidge* (com o tubo coletor) e centrifugada a 12.000g por 15 segundos a TA. Em seguida, 700 μ L do *Buffer RWT* foi adicionado e novamente a *Spin Cartidge* centrifugada por 8.000g por 15 segundos a TA. Após a centrifugação, 500 μ L do *Buffer RPE* foi adicionado e centrifugado a 8.000g por 15 segundos a TA. Novamente, 500 μ L do *Buffer RPE* foi adicionado e centrifugado a 8.000g por 2 minutos a TA. Para a eluição do microRNA, 30 μ L de água *RNase-free* foi acrescentado e a *Spin Cartidge* centrifugada por 8.000g por 1 minuto a TA. Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.10 Validação da qualidade e integridade do RNA

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, na presença de GelRed™ (Biotium, USA), para determinação de sua qualidade e integridade. A eletroforese em gel de agarose foi realizada com corrente elétrica de 90 volts durante 40 minutos e então as bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico foram visualizadas em um transiluminador UV. Após a constatação da integridade e

qualidade do RNA, este foi utilizado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa.

5.11 Transcrição reversa do RNA

O cDNA foi sintetizado a partir do kit comercial *RT2 First Strand Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e utilizado para a análise da expressão gênica diferencial. Inicialmente, as amostras de RNA (quantidade inicial de 500 ng) foram incubadas com 2 µL do *Buffer GE* e água *nuclease-free* (q.s.p 10 µL) a 42°C por 5 minutos para a eliminação do DNA genômico e transferidas imediatamente para o gelo. Em seguida, para cada amostra de RNA, foram adicionados 4 µL do *Buffer BC3 (5x)*, 1 µL de *Control P2*, 2 µL do *RE3 Reverse Transcriptase Mix* e água 3 µL de água *nuclease-free*. A reação foi processada em termociclador por 15 minutos a 42°C e, em seguida, por 5 minutos a 95°C. Por fim, 91 µL água *nuclease-free* foram adicionados, completando o volume final de 111 µL.

5.12 RT² Profiles PCR array

Essa técnica permite a análise da expressão diferencial gênica utilizando a metodologia de PCR em tempo real. Para cada amostra, foi feito um mix contendo 102 µL de cDNA 135 µL de 2x RT2 SYBR Green Mastermix 1248 µL de água *nuclease-free*. Em seguida, foram distribuídos 25 µL do mix em cada poço de uma placa de 96 poços contendo primers específicos para 84 diferentes genes relacionados a inflamação e 8 genes endógenos (PAHS – 077ZA RT2 Profiler PCR array **Human Inflammatory Response & Autoimmunity**, Qiagen, Valencia, CA, USA):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BCL6	C3	C3AR1	CCL11	CCL13	CCL16	CCL17	CCL19	CCL2	CCL21	CCL22	CCL23
B	CCL24	CCL3	CCL4	CCL5	CCL7	CCL8	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR7	CD14
C	CD40	CD40LG	CEBPB	CRP	CSF1	CXCL1	CXCL10	CXCL2	CXCL3	CXCL5	CXCL6	CXCL9
D	CXCR1	CXCR2	CXCR4	FASLG	FOS	IFNG	IL10	IL10RB	IL15	IL17A	IL18	IL1A
E	IL1B	IL1R1	IL1RAP	IL1RN	IL22	IL23A	IL23R	IL5	IL6	IL6R	IL8	IL9
F	ITGB2	KNG1	LTA	LTB	LY96	MYD88	NFKB1	NOS2	NR3C1	PTGS2	RIPK2	SELE
G	TIRAP	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR9	TNF	TNFSF14	TOLLIP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

A reação foi processada no equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Além disso, antes da realização da PCR em tempo real para cada amostra, a qualidade das mesmas foi avaliada. Para isso, foi realizada uma PCR em tempo real com o RNA e o cDNA, na qual vários controles foram testados (RT2 RNA QC PCR array, Qiagen, Valencia, CA, USA). Foram validadas 12 amostras em cada placa controle:

cDNA	A1 HK1	2 HK1	3 HK1	4 HK1	5 HK1	6 HK1	7 HK1	8 HK1	9 HK1	10 HK1	11 HK1	12 HK1
	B HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2
	C RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC
	D PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
	E GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC
RNA	F NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT
H2O	G PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
	H NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

HK – Housekeeping gene; **RTC** – Reverse Transcription Control; **PPC** – Positive PCR Control; **GDC** – Genomic DNA Control; **NRT** – No Reverse Transcription Control; **NTC** – No Template Control.

A reação também foi processada no equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

5.13 Dosagens de citocinas no soro

As dosagens das citocinas BAFF e APRIL foram feitas pela técnica de multiplex (Magnetic Luminex Assay, R&D System Inc., Minnesota, EUA). Inicialmente, as proteínas de cada curva padrão (9 curvas padrão: B, C, D, H, I, J, O, Q, R - lote L121427) foram reconstituídas em 250 µL de *calibrator diluent RD6-52* e incubadas por 15 minutos sob agitação leve. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de cada curva padrão e 100 µL de *calibrator diluent RD6-52* (volume final de 1000 µL), estabelecendo o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada a diluição seriada (1:3). As micropartículas de captura foram diluídas em *diluent RD2-1* (500 µL de micropartícula e 5000 µL de diluente), os anticorpos biotinilados também foram diluídos em *diluent RD2-1* (500 µL de anticorpos e 5000 µL de diluente) e a estreptavidina-PE em *wash buffer* (220 µL de estreptavidina e 5035 µL de tampão). As amostras foram diluídas 2 vezes em *calibrator diluent RD6-52* (30 µL de amostra e 30 µL de tampão).

Em seguida, em uma placa de 96 poços, foram pipetados 50 µL das micropartículas, 50 µL da curva padrão ou 50 µL de cada amostra e a placa foi incubada por 2 horas à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, a placa foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de 3 lavagens com 100 µL de *wash buffer*. A placa foi retirada do magneto, 50 µL de anticorpos biotinilados foram adicionados em cada poço e novamente a placa foi incubada por 1 hora à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 50 µL de estreptavidina-PE foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Por fim, a placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 100 µL *wash buffer* foram adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 2 minutos à 850 rpm e colocada no aparelho (Bio-Plex 200) para a leitura.

5.14 Dosagem de Proteína C reativa

Os níveis séricos de PCR foram quantificados por nefelometria no Laboratório de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

5.15 Anti-Scl-70

Os níveis séricos do autoanticorpo anti-Scl-70 foram dosados com o Kit "Anti-scl70 IgG ELISA" (Abcam) seguindo as recomendações do fabricante.

Análise estatística

6. Análise estatística

Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica, mudanças no escore de Rodnan modificado, níveis séricos de PCR dos pacientes nos períodos pós-transplante com os dados obtidos pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos (pacientes com doença estável *versus* pacientes que sofreram reativação da doença) foi realizada pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Os programas estatísticos utilizados foram o *R version 3.6.1* (R development Core Team 2017) e o *GraphPad® Prism for Windows* (versão 6.0).

Resultados

7. Resultados

7.1 Resultados clínicos

Alguns pacientes apresentaram efeitos colaterais leves associados ao transplante, tais como febre, náusea e vômito, mas que cessaram após tratamento específico. Todos os pacientes apresentaram diminuição significativa do mRss, dos níveis séricos de PCR e de anti-scl70 ao longo do seguimento após o TACTH (**Figura 4**), corroborando os dados da literatura, sendo possível reafirmar a eficácia do TACTH em promover remissão e/ou estabilização da doença em pacientes com ES grave, refratários à terapia convencional, sem a necessidade do uso de terapias adicionais após o transplante (Farge et al. 2017b; van Laar et al. 2014; Del Papa et al. 2016; Snowden et al. 2017).

A maioria dos pacientes apresentou boa resposta clínica ao TACTH, porém seis pacientes sofreram reativação da doença e reiniciaram o uso de medicamentos imunossupressores. Entende-se como reativação da doença o aumento de 25% do mRss ou diminuição de 10% da capacidade pulmonar vital forçada (FVC) medida por espirometria, em relação aos valores da última avaliação pós-TACTH (Burt et al. 2013).

Para avaliar os perfis de reconstituição imunológica e possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica, os pacientes foram retrospectivamente subdivididos em: pacientes que sofreram reativação da doença (**grupo reativados**) e pacientes com a doença estável (**grupo respondedores**) após o TACTH.

Figure 4. Evolução clínico-laboratorial dos pacientes com ES tratados com TACTH. Os pacientes foram acompanhados previamente e prospectivamente após o TACTH (n=24). **(A)** do Avaliação global do mRss modificado. **(B)** Avaliação individual do mRss, **(C)** dos níveis séricos do autoanticorpo anti-scl70. **(D)** níveis séricos do de PCR. As extremidades das caixas indicam o 3º e 4º quartis, as linhas dentro das caixas indicam a média e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os dados estão mostrados como média e ($\pm$ SD). * $P < .05$, ** $P < .001$, *** $P < .0001$.

7.2 Reconstituição de subpopulações de células B convencionais

Os efeitos do TACTH nas células B e na resposta imune humoral foram menos estudados em relação as células T (Malmegrim et al. 2018). Nesse trabalho, portanto, avaliamos a reconstituição quantitativa das subpopulações de células B com duas abordagens diferentes de imunofenotipagem e classificação. Na primeira abordagem foi utilizada a expressão dos marcadores CD27 e IgD para caracterização das subpopulações de células B no sangue periférico (**Apêndice 9**).

Nos primeiros 30 dias após o transplante foi observada uma diminuição significativa da frequência e do número absoluto de células B naïve ($CD19^+CD27^-IgD^+$) em decorrência da imunoablação promovida pelo regime de condicionamento. Após 60 dias, a contagem absoluta era semelhante ao período pré-transplante. No

entanto, ambas as contagens atingiram os níveis mais elevados 360 dias após o transplante (**Figura 5**).

Figure 5. Reconstituição das subpopulações de células B naïve em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica baseada na expressão dos marcadores CD27 e IgD em células B periféricas de pacientes com ES (N=21). Análise da frequência (esquerda) e dos valores absolutos (direita) de células B naïve. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão retratados como média e ($\pm$ SD). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, ou *** $P < 0.0001$. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pré- e pós-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon.

Para avaliar a eficácia do TACTH em promover a eliminação de células de memória, quantificou-se a reconstituição de células B de memória sem mudança de classe (do inglês, *switch*) (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) e de células B de memória com mudança de classe (CD19⁺CD27⁺IgD⁻). Houve uma diminuição dos números absolutos de ambas subpopulações até 180 dias após o transplante. No entanto, apesar de ter sido observado um aumento da frequência de células B de memória classe 30 dias pós-transplante, as frequências de ambas subpopulações diminuíram a partir de 60 dias e permaneceram diminuídas até o fim do seguimento (**Figura 6A e 6B**). A frequência e a contagem absoluta de plasmócitos (CD19⁺IgD⁻CD27^{hi}) permaneceram abaixo dos valores basais (pré-transplante) durante o período entre 60 e 180 dias após o transplante (**Figura 6C**).

Houve um aumento da frequência de células B de memória duplo negativas 30 dias após o transplante, seguido de uma diminuição até 180 dias. Os números absolutos diminuíram transientemente 60 dias após o transplante (**Figura 6D**). Vale ressaltar que os pacientes que sofreram reativação da doença apresentaram uma

maior frequência de células B duplo negativas durante os primeiros 120 dias após o transplante em comparação aos pacientes respondedores (**Figura 6E**). Além disso, foi observado uma forte correlação positiva entre a frequência dessa subpopulação celular e o mRss (**Figura 6F**).

Figure 6. Reconstituição das subpopulações de células B de memória em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica baseada na expressão dos marcadores CD27 e IgD em células B periféricas de pacientes com ES (n=21) por citometria de fluxo. Análise da frequência e dos valores absolutos das subpopulações (A) CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (memória sem switch de classe), (B) CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (memória com switch de classe), (C) CD19⁺IgD⁻CD27^{hi} (plasmócito), (D) CD19⁺IgD⁻CD27⁻ (memória duplo negativa), (E) Mediana (±IQR) da porcentagem de células B duplo negativas, respondedores versus reativados, (F) correlação entre a frequência de células B duplo negativas e valores do escore de Rodnan modificado (teste Spearman). Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limites marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos se deu pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

Paralelamente, caracterizamos as células B convencionais com base na expressão dos marcadores CD38 e IgD, que permite a classificação em Bm1 a Bm5. Essa abordagem reflete os diversos estágios de maturação das células B (**Apêndice 10**). Houve diminuição da frequência e da contagem absoluta de células B naïve (Bm1) e naïve ativadas (Bm2) nos primeiros 120 dias, seguido de um aumento da frequência e da contagem absoluta das Bm2 360 dias após o transplante (**Figura 7A**

e B). Houve uma diminuição transiente da contagem absoluta e da frequência de células B pré-centro germinativo (Bm2') 120 e 360 dias, respectivamente, após o transplante (**Figura 7C**).

A frequência de centroblastos+centrócitos (Bm3+4) diminuiu significativamente 360 dias após o transplante, sem alterações do número absoluto ao longo do seguimento (**Figura 7D**). As frequências de células B de memória recente (*Early Bm5*) e de memória tardia (*Late Bm5*) diminuíram 360 dias após o transplante, no entanto, a diminuição dos números absolutos dessas subpopulações diminuíram apenas transientemente (**Figura 7E, 7F**).

Figure 7. Reconstituição das subpopulações de células B convencionais em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica baseada na expressão dos marcadores CD38 e IgD em células B periféricas de pacientes com ES (n=21) por citometria de fluxo. Análise da frequência e dos valores absolutos das subpopulações (A) CD19⁺CD38⁻IgD⁺ (Bm1), (B) CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2), (C) CD19⁺ IgD⁺CD38^{hi} (Bm2'), (D) CD19⁺IgD⁻CD38^{hi} (Bm3+4) (E) CD19⁺IgD⁻CD38⁺ (early Bm5) (F) CD19⁺CD38⁻IgD⁻ (late Bm5). Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos se deu pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

Griffin e colaboradores descreveram um pequeno subgrupo de células B no sangue periférico e cordão umbilical humanos, caracterizadas pelo imunofenótipo CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻, que possuem características funcionais semelhantes as células de memória B1 murinas (Griffin et al. 2011). Nenhum trabalho até o momento analisou a reconstituição dessa subpopulação de células B no contexto do TACTH para doenças autoimunes. Observamos um aumento transiente da frequência dessas células nos primeiros 30 dias pós-transplante, seguido por uma diminuição persistente até 360 dias após o transplante. O número absoluto permaneceu em níveis inferiores ao basal até 180 dias após o transplante. Os pacientes com ES que responderam ao transplante apresentaram maior contagem absoluta dessas células nos períodos de 180 e 360 dias após o TACTH (**Figura 8**).

Figura 8. Reconstituição das subpopulações de células B de memória tipo B1 (CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻) em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica de células B de pacientes com ES (n=21) por citometria de fluxo. **(A)** Frequência relativa e contagem absoluta de células B de memória tipo B1, **(B)** mediana (±IQR) da porcentagem de células B de memória tipo B1 no grupo de pacientes com ES respondedores ou reativados. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limites marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão retratados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limites marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média ± desvio padrão. * P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos se deu pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

Concomitantemente, avaliamos a reconstituição de células B PD-1⁺, bem como a expressão desse marcador através da análise de MFI. Essa molécula funciona como regulador negativo da proliferação e diferenciação de células B, bem como da mudança de classe de isotipo (Thibult et al. 2012). Observamos um aumento transiente da expressão de PD-1 nas células B periféricas 30 dias após o transplante. Além disso, os pacientes que sofreram reativação da doença apresentaram uma maior frequência de células B PD-1⁺ em comparação aos pacientes respondedores nesse mesmo período, indicando uma maior proliferação homeostática de células B nos pacientes reativados (**Figura 9**).

Figura 9. Reconstituição das subpopulações de células B PD-1⁺ em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica de células B de pacientes com ES (n=21) por citometria de fluxo. **(A)** Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de PD-1 em células B CD19⁺. **(B)** mediana (±IQR) da porcentagem de células B PD-1⁺ no grupo de pacientes com ES respondedores ou reativados. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão retratados como média e (±SD). * P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos se deu pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

7.3 Reconstituição das células B reguladoras

Trabalhos recentes têm mostrado o importante papel de subpopulações de Bregs no controle da autoimunidade e manutenção da homeostasia do sistema imune (WANG 2019, MOORE 2019, MAURI 2017). Perante ao exposto, avaliamos nesse trabalho a reconstituição quantitativa e funcional de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ nos pacientes com ES tratados com TACTH.

7.3.1 Células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}

Houve um aumento significativo da frequência e da contagem absoluta de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} no sangue periférico dos pacientes com ES até 360 dias após o transplante (**Figura 10A**). Observamos que os pacientes que sofreram

reativação a doença apresentaram menor frequência de Bregs antes e após o transplante, em comparação com os pacientes respondedores (**Figura 10B**). Além disso, encontramos uma forte correlação negativa entre a frequência de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e o escore de Rodnan modificado (**Figura 10C**).

Além disso, mostramos que o TACTH foi capaz de restaurar a capacidade imunossupressora das células B. Houve um aumento da produção de IL-10 *in vitro*, após estímulo via TLR9 e CD40, por células B totais e Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (**Figura 10D e E**).

Figure 10. Análise quantitativa e qualitativa da subpopulação de células B reguladoras (Bregs) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi realizada a caracterização imunofenotípica de células Bregs de pacientes com ES (n=24) por citometria de fluxo (**A**) Frequência relativa e contagem absoluta de células Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. (**B**) Mediana (±IQR) da frequência de células Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} nos grupos de pacientes respondedores e reativados. (**C**) Correlação entre a frequência de Bregs e escore de Rodnan modificado (teste Sperman). (**D**) Produção de IL-10 por células B CD19⁺ (n=4). (**E**) Produção de IL-10 por células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (n=4). PBMCs foram cultivadas durante 42 horas com CPG e rhCD40L, em seguida re-estimuladas com PMA + ionomicina + brefeldina (PIB) nas últimas 6 horas de cultura. Após estímulo as células foram fixadas, permeabilizadas e a produção intracelular de IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. A comparação entre os diferentes grupos se deu pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Para os ensaios de produção de citocinas por células B foi utilizado o teste *t* pareado.

Em seguida, observamos que a depleção de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} do *pool* de PBMCs colhidas dos pacientes após o TACTH e estimuladas *in vitro* com anti-CD3/CD28 (na proporção 1:1) levou a um aumento significativo da frequência de células T CD4⁺Ki67⁺, T CD4⁺ IFN-γ⁺ e de células T CD4⁺ TNF-α⁺ na cultura. Em contraste, a depleção de Bregs do *pool* de PBMCs colhidas no período pré-transplante não causou qualquer aumento significativo da frequência de células T

CD4⁺Ki67⁺, T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e de células T CD4⁺ TNF- α ⁺ após estímulo proliferativo *in vitro* (Figura 11A – F).

Figura 11. Proliferação de células T efectoras e produção de citocinas intracelulares por estas após estímulo *in vitro* na presença ou ausência de Bregs. PBMCs totais e/ou depletadas de Bregs foram cultivadas durante 60 horas com anti-CD3/CD28 na proporção 1:1. Em seguida foram re-estimuladas com PMA + ionomicina + Brefeldina (PIB) nas últimas 6 horas de cultura. Após o estímulo, as células foram fixadas, permeabilizadas e a produção intracelular de Ki67, IFN- γ e TNF- α foi avaliada por citometria de fluxo. (A) T CD4⁺Ki67⁺ pré-TACTH. (B) T CD4⁺Ki67⁺ pós-TACTH. (C) T CD4⁺ IFN- γ ⁺ pré-TACTH. (D) T CD4⁺ IFN- γ ⁺ pós-TACTH (E) T CD4⁺ TNF- α ⁺ pós-TACTH (F) T CD4⁺ TNF- α ⁺ pós-TACTH. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de produção de citocinas e Ki67 por células T CD4⁺ foi utilizado teste *t* pareado.

7.3.2 Células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺

Paralelamente avaliamos a reconstituição de outra subpopulação de Bregs (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) nos pacientes com ES tratados com TACTH. Houve uma diminuição transiente da frequência dessas células, sem alterações do número absoluto ao longo do seguimento (**Figura 12A**). Além disso, o transplante foi capaz de promover, mesmo transientemente, o aumento da produção de IL-10 por essa subpopulação de Bregs (**Figura 12B**).

Figure 12. Análise quantitativa e qualitativa da subpopulação de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ em pacientes com ES tratados com TACTH. (A) Frequência relativa e contagem absoluta de Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (n=20) **(B)** Produção de IL-10 por Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (n=4). PBMCs foram cultivadas durante 42 horas com CPG e rhCD40L, em seguida re-estimuladas com PMA + ionomicina + Brefeldina (PIB) nas últimas 6 horas de cultura. Após o estímulo as células foram fixadas, permeabilizadas e a produção intracelular de IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Os limites das caixas indicam os percentis 25th e 75th, as linhas dentro das caixas indicam a mediana e os limite marcam os percentis 10th e 90th. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de reconstituição imunológica dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. Para comparação dos resultados de produção de citocinas foi utilizado teste *t* pareado.

7.4 Avaliação da produção de citocinas pró-fibróticas por células B

Com base na associação entre fibrose tecidual e produção aberrante de IL-6 e TGF- β por células B em pacientes com ES (François et al. 2013; Yehudai et al. 2012), avaliamos a produção dessas citocinas *in vitro*. Após estímulo via TLR9 e CD40, foi observada uma produção diminuída de IL6 até 360 dias após o transplante (**Figura 13A**) e uma diminuição transiente da produção de TGF- β 1, 180 dias após o

procedimento. (**Figura 13B**). Pela primeira vez na literatura foi demonstrado que TACTH é capaz de reverter o potencial pró-fibrótico das células B em pacientes com ES.

Figura 13. Frequência de células B produtoras de IL-6 ou TGF-β1 em paciente com ES tratados com TACTH. (A) Produção de IL-6 e (B) TGF-β1 por células B CD19⁺ (n=4). PBMCs foram cultivadas durante 42 horas com CpG e rhCD40L, em seguida por re-estimuladas com PMA + ionomicina + Brefeldina (PIB) nas últimas 6 horas de cultura. Após o estímulo as células foram fixadas, permeabilizadas e a produção intracelular de IL-6 e TGF-β1 foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão mostrados como média e (±SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de produção de citocinas nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado teste *t* pareado.

7.5 Avaliação da fosforilação das proteínas de sinalização intracelular STAT3, ERK1/2 e p38MAPK

Vias de sinalização intracelulares são essenciais para transdução de sinais envolvidos na produção de citocinas por células B (Masson et al. 2015). Diante disso, avaliamos a fosforilação das proteínas STAT3, ERK1/2 e p38MAPK no *pool* de células B CD19⁺ colhidas dos paciente com ES pré- e pós-TACTH. Após estímulo *in vitro* via TLR9, demonstramos um aumento da fosforilação das proteínas ERK1/2 (**Figura 14A**) e p38MAPK (**Figura 14B**) até 360 dias pós-transplante. No entanto,

não houve diferença na fosforilação de STAT3 (**Figura 14C**) durante todo o seguimento pós-transplante.

Figure 14. Fosforilação das proteínas sinalizadoras ERK1/2, p38MAPK e STAT3 em células B CD19⁺ de pacientes com ES tratados com TACTH. Inicialmente, PBMCs (n=3 de cada período) foram cultivadas durante 30 minutos com CPG, após o estímulo, as células foram fixadas, permeabilizadas e a fosforilação das vias de sinalização ERK1/2 (A), p38MAPK (B) e STAT3 (C) intracelular avaliada por citometria de fluxo. Os dados estão mostrados como média e ($\pm$ SD). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados de fosforilação nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado teste *t* pareado.

7.6 Quantificação sérica das citocinas BAFF e APRIL

BAFF e APRIL são citocinas que desempenham um papel fundamental para sobrevivência e maturação de células B. Além disso, altos níveis dessas citocinas foram associados a piora do acometimento cutâneo em pacientes com ES (Matsushita et al. 2018).

Em nosso trabalho, os níveis de BAFF aumentaram transientemente 180 dias após o transplante (**Figura 15A**). Além disso, os pacientes que sofreram reativação da doença apresentaram níveis mais elevados dessa citocina, em comparação com os pacientes respondedores (**Figura 15B**). Em contraste, a concentração sérica de APRIL diminuiu transientemente 60 dias pós-TACTH.

Figure 15. Concentração sérica das citocinas BAFF e APRIL em pacientes com ES tratados com TACTH. Concentração (pg/mL) de BAFF (A) e de APRIL (B) no soro de pacientes com ES (n=20) antes e após o TACTH, determinada por ensaio multiplex. (C) Mediana (±IQR) da concentração de BAFF nos grupos de pacientes respondedores ou reativados. Os dados estão retratados como média e (±SEM). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001. Para comparação dos resultados da produção de citocinas plasmáticas dos pacientes com ES nos períodos pós-transplante aos dados pré-transplante, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon.

7.7 Análise da expressão diferencial de genes envolvidos com resposta inflamatória e autoimunidade em pacientes com ES tratados com TACTH

Com objetivo de investigar o efeito do TACTH na modulação do sistema imune em nível molecular, avaliamos a expressão de 84 genes envolvidos em resposta inflamatória e autoimunidade em PBMCs colhidas de 4 pacientes com ES, no período pré-transplante e respectivos períodos pós-transplante (180 e 360 dias).

Os dados de expressão gênica foram filtrados e normalizados usando a expressão do gene beta-2-microglobulin (B2M), permitindo a comparação entre os diferentes períodos avaliados. O resultado de expressão gênica diferencial dos

pacientes no período pós-TACTH foi expresso pelo número de vezes (*fold change*) de aumento ou diminuição da expressão do gene em relação ao período pré-transplante. Foram considerados somente os genes que mostraram expressão diferencial com *fold change* ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 e valor de $P \leq 0.05$.

Observamos uma alteração significativa no perfil de expressão gênica global apenas no período 360 dias pós-TACTH (**Figura 16A**). As análises de clusterização das amostras avaliadas demonstraram alta similaridade de expressão gênica entre os períodos pré-transplante e 180 dias pós-TACTH (**Figura 16B**). Dos 84 genes avaliados, 13 genes (~15%) foram diferencialmente expressos no período D+360 em comparação com o período pré-transplante (**Tabela 1**). Esta lista inclui genes codificadores das citocinas IL-22, IL-6 e IFN- γ e da proteína MD-2, todos regulados negativamente. Em contraste, genes envolvidos na expressão de TLR9 e CD40L foram positivamente regulados no período 360 dias pós-TACTH.

Figura 16. Perfil de expressão gênica em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi avaliada a expressão de 84 genes envolvidos em resposta inflamatória e autoimunidade em PBMCs colhidas de pacientes com ES (N=4), nos períodos pré-transplantes e pós-transplantes (180 e 360 dias). Os resultados de expressão diferencial foram expressos pelo número de vezes (fold change) de aumento ou diminuição da expressão dos genes no período pré-transplantes (Pré-TACTH) em relação aos períodos pós-transplantes, D+180 e D+360. Foram considerados diferencialmente expressos apenas os genes que apresentaram o fold change (RQ) ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 e valor de $P \leq 0.05$. (A) Plot genes analisados em pacientes ES, símbolos coloridos de vermelho indicam genes diferencialmente expressos. Log2fold-changes positivos indicam genes superexpressos. Log2fold-changes negativos indicam genes regulados negativamente. (B) Heat map representa a expressão gênica durante os três períodos analisados. Valores positivos indicam genes superexpressos. Valores negativos indicam genes regulados negativamente.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos em pacientes com ES tratados com TACTH. Foi avaliada a expressão de genes em PBMCs colhidas de pacientes com ES (n=4), nos períodos pré-transplantes e pós-transplantes (180 e 360 dias). Os resultados de expressão diferencial foram expressos pelo número de vezes (fold change - RQ) de aumento ou diminuição da expressão dos genes no período pré-transplantes em relação aos períodos pós-transplantes, D+180 e D+360. Foram considerados diferencialmente expressos apenas os genes que apresentaram o fold change (RQ) ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 e valor de $P \leq 0.05$.

D+180		D+360	
Gene	RQ	Gene	RQ
		BCL6	-1.0993
		C3AR1	1.31805
		CCL2	1.16781
		CCR4	1.29885
		CCR7	1.35354
		CD40L	1.01727
		CXCL5	1.39242
		CXCR2	-1.754
		IFNG	-3.481
		IL22	-1.807
		IL6	-1.960
		MD2	-1.121
		TLR9	1.431

Discussão

8. Discussão

8.1 Resposta clínica dos pacientes com ES após o TACTH

Nos últimos anos estudos, têm demonstrado que o TACTH constitui uma importante alternativa terapêutica para pacientes com doenças autoimunes graves, refratários aos tratamentos convencionais, pois é um tratamento capaz de induzir remissões clínicas prolongadas, livres de sintomas e sem necessidade de tratamentos adicionais (Muraro et al. 2017; Swart et al. 2017).

O racional do TACTH para doenças autoimunes é a eliminação de células T e B autorreativas pelo regime de condicionamento, seguida pela reconstituição de um sistema imune novo, diverso e autotolerante, a partir das CTHs autólogas, mecanismo denominado "*reset imunológico*" (Abrahamsson and Muraro 2008; Muraro et al. 2014; Muraro et al. 2005). A geração de células reguladoras, incluindo Bregs e Tregs, deve contribuir para modulação da ativação de células T e B efectoras autorreativas residuais (que sobreviveram ao regime de condicionamento) ou foram reinfundidas junto com o enxerto de CTHs autólogas (Arruda et al. 2018b; Arruda et al. 2016b; Delemarre et al. 2016).

Em geral, os pacientes com ES avaliados nesse trabalho apresentaram resposta clínica satisfatória e prolongada, com diminuição progressiva do acometimento fibrótico cutâneo (pelo mRss), melhora do quadro inflamatório (pela quantificação dos níveis séricos de PCR) e autoimune (pela diminuição dos níveis séricos do autoanticorpo anti-ScI70), corroborando outros estudos da literatura que mostram a eficácia terapêutica do TACTH em comparação com terapias convencionais (Burt et al. 2018; Burt et al. 2011; Farge et al. 2005; van Laar et al. 2014; Sullivan et al. 2018).

Seis (25%) dos 24 pacientes transplantados apresentaram reativação clínica da doença após o TACTH e reiniciaram o uso de medicamentos imunossupressores. Além disso, houve um óbito em decorrência da reativação e consequente progressão da doença, 1 ano após o transplante. De fato, estudos têm demonstrado que aproximadamente 20% dos pacientes com ES sofrem reativação clínica após o transplante (Farge et al. 2010; Walker et al. 2018).

Nesse contexto, estudos translacionais são de extrema importância para melhoria do manejo clínico e dos protocolos de transplante utilizados, visando

aumentar a segurança e a eficácia terapêutica do TACTH para diferentes doenças autoimunes (Arruda et al. 2018b; Arruda et al. 2018a; Burt et al. 2011; Burt et al. 2009; Farge et al. 2010; van Laar et al. 2014; Malmegrim et al. 2017; Muraro et al. 2014; Snowden et al. 2017).

8.2 Cinética de reconstituição de células B após o TACTH

As células B exercem diversas funções na patogênese de doenças autoimunes. Além da produção de autoanticorpos, as células B contribuem para a autoimunidade através da apresentação de autoantígenos, produção de citocinas, regulação da diferenciação e/ou ativação de células T, células dendríticas e de macrófagos (Cui et al. 2015; Gonzalez et al. 2011; Yuseff et al. 2013). Além disso, desde a aprovação do uso do rituximab para o tratamento de pacientes com artrite reumatoide grave e refratários a terapia com anti-TNF- α , emergiu o conceito de que as células B constituem um importante alvo terapêutico para tratamento de doenças autoimunes (Tsokos 2004). Recentemente, Elhai e colaboradores demonstraram que pacientes com ES tratados com rituximab apresentaram uma melhora significativa do acometimento cutâneo (Elhai et al. 2015).

Nesse contexto, nosso estudo avaliou a reconstituição quantitativa e qualitativa de células B convencionais e reguladoras após o TACTH em pacientes com ES, com objetivo de compreender um pouco mais sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de indução/restabelecimento da autotolerância e, possivelmente, de revelar biomarcadores de resposta terapêutica.

8.2.1 Células B naïve

A caracterização de células B no sangue periférico é realizada pela expressão de quatro marcadores de superfície, CD19, IgD, CD38 e CD27 (Todeschini et al. 2013). Inicialmente, de acordo com a expressão dos marcadores CD27 e IgD, foi possível observar uma diminuição significativa do número absoluto e da frequência de células B naïve, em decorrência da imunoablação promovida pelo regime de condicionamento. No entanto, 1 ano após o transplante as células naïve alcançaram níveis acima dos encontrados no período pré-TACTH, indicando uma atividade medular eficaz pelo aumento da neogênese de células B naïve.

8.2.2 Células B de memória convencionais

As células B de memória convencionais diferem-se das células B naïve em diversos aspectos funcionais. Independente do seu subtipo (*i.e.* com ou sem mudança de classe de isotipo), as células B de memória são capazes de responder a antígenos rapidamente, entrar em ciclo celular e se diferenciar em plasmócitos através da interação com células T nos centros germinativos nos linfonodos (Crotty 2011; Victora et al. 2010). Simultaneamente a produção de plasmócitos de vida curta, os centros germinativos podem originar plasmócitos de vida longa. Essas células migram para a medula óssea e são capazes de secretar altos níveis de anticorpos por tempo indeterminado, variando de dias a anos. No entanto, diferentemente dos seus precursores, os plasmócitos de longa vida perdem a expressão do MHC-II e não são capazes de apresentar antígenos. Além disso, as células B de memória expressam BCR de alta afinidade, o que favorece as funções efectoras dos anticorpos e permite a detecção de antígenos em baixíssimas concentrações (Budeus et al. 2015).

Diversos estudos têm demonstrado que as células B que não expressam CD27 e IgD, denominadas células B de memória duplo negativas (células B DN), estão expandidas no sangue periférico de pacientes com AR, LES e ES em comparação com indivíduos saudáveis (Wei et al. 2007). No entanto, a função dessas células ainda é pouco compreendida. Recentemente, Jenks e colaboradores demonstraram que as células B DN de pacientes com LES são hiperresponsivas ao estímulo via TLR7, levando a geração de plasmócitos autorreativos. Além disso, as células B DN estão mais expandidas em pacientes com doença ativa (*i.e.* com altos níveis séricos de autoanticorpos e nefrite lúpica), em comparação com pacientes com doença inativa. Adicionalmente, utilizando técnicas de citometria de fluxo, epigenômica e transcriptômica, os pesquisadores sugeriram que as células B DN pertencem a uma linhagem única e são específicas para autoantígenos (Jenks et al. 2018). No contexto da ES, Simon e colaboradores observaram uma maior frequência dessas células em pacientes com ES difusa e portadores de fibrose pulmonar em comparação com pacientes que apresentam a forma limitada da doença e sem acometimento pulmonar (Simon et al. 2016).

Todas essas características supracitadas fazem com que as células B de memória convencionais sejam o principal alvo das terapias de depleção de células B. Nesse contexto, observamos que o TACTH é capaz de promover uma diminuição

transiente do número absoluto de células B de memória com e sem mudança de classe e de B DN até 6 meses após o transplante. O número absoluto de plasmócitos diminuiu consideravelmente durante todo o seguimento, concomitantemente com a redução dos níveis do autoanticorpo anti-Scl70.

Além disso, observamos um aumento da frequência das células B de memória nos primeiros 30 dias pós-transplante. O aumento da frequência dessas células é consequência da proliferação homeostática induzida pelo ambiente linfopênico pós-transplante, indicando a presença de células B residuais que sobreviveram ao regime de condicionamento, ou foram reinfundidas junto com o enxerto de CTHs. Ademais, os pacientes que reativaram a doença apresentaram uma maior frequência de células B DN nos períodos iniciais após o TACTH. Adicionalmente, a frequência de células B DN apresentou correlação positiva com mRss.

Paralelamente, observamos um aumento da expressão de PD-1 pelas células B. O PD-1 é uma molécula expressa constitutivamente em células B não-ativadas, porém, aumenta consideravelmente sua expressão após ativação celular, desempenhando um papel importante na regulação das células B ao promover sinais de inibição de proliferação (Thibult et al. 2012). Os pacientes que sofreram reativação da doença apresentaram maior frequência de células PD-1⁺, sugerindo a presença de um maior número de células B residuais em proliferação homeostática nesses pacientes. De fato, a proliferação e ativação de células B autorreativas residuais ou reinfundidas pode levar a um desfecho clínico desfavorável.

Por outro lado, o aumento da expressão de PD-1 nos períodos iniciais após o TACTH também pode favorecer um perfil regulador das células B. Recentemente, Wang e colaboradores demonstraram que células B PD1⁺ também expressam níveis elevados de PD-L1. Estímulos contínuos via BCR e/ou CD40 podem promover o aumento da expressão de PD-1 e PD-L1 em células B. Os autores observaram em experimentos *in vitro* que células B PD-1⁺ suprimem de maneira significativa a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ estimuladas via CD3/CD28 por uma via dependente de PD-L1 e independente de IL-10, uma vez que o bloqueio de PD-L1 na co-cultura aumentou a proliferação das células T (Wang et al. 2019).

O ambiente linfopênico induz proliferação celular através de estímulo antigênico (estranho ou próprio) e/ou por citocinas, dentre as quais podemos destacar o BAFF e o APRIL (Woodland and Schmidt 2005). Essas citocinas

desempenham importante papel na ativação e sobrevivência das células B maduras e plasmócitos na periferia, sendo produzidas principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Vincent et al. 2013).

No presente estudo, observamos um aumento transiente dos níveis séricos de BAFF e uma diminuição transiente dos níveis de APRIL após o transplante. Além disso, os pacientes que reativaram a doença apresentaram maiores concentrações séricas de BAFF 6 meses após o transplante, em comparação com pacientes respondedores. De fato, alguns estudos tem demonstrado que pacientes com ES apresentam altos níveis de BAFF e APRIL, e que este aumento está correlacionado com aumento da fibrose (Matsushita et al. 2006).

Recentemente, Matsushita e colaboradores demonstram que no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, o BAFF é capaz de induzir a produção de IL-6 por células B efectoras, ao mesmo tempo que diminui a produção de IL-10 por Bregs. Portanto, este aumento de BAFF, mesmo que transiente, pode influenciar não apenas na reconstituição das células B, mas também no desfecho clínico dos pacientes após o transplante, uma vez que o BAFF promove também a sobrevivência de células B autorreativas (Matsushita et al. 2018).

As análises das subpopulações de células B convencionais baseada na expressão dos marcadores IgD e CD38 (células Bm1-5) demonstram um perfil semelhante aos das análises baseadas na expressão de CD27 e IgD, com aparente renovação do *pool* de células B naíve e diminuição transiente das subpopulações de células B de memória.

8.2.3 Células B de memória do tipo B1

As células B de memória do tipo B1 diferem-se das células B de memória convencionais, principalmente devido a sua capacidade de produzir anticorpos de maneira independente de células T, os chamados anticorpos naturais, que são predominantemente da classe IgM. Este anticorpos fornecem proteção imediata contra infecções, enquanto o sistema imunológico monta uma resposta adaptativa específica e de longo prazo (Griffin et al. 2011).

No presente estudo, observamos um aumento transiente da frequência das células B de memória do tipo B1 30 dias após o transplante, sugerindo um papel dessas células e de anticorpos naturais na regulação do ambiente linfopênico nos

períodos iniciais após o transplante. Além disso, observamos uma diminuição transiente do número absoluto dessas células nos primeiros 6 meses após o transplante. De maneira notável, pacientes que responderam ao transplante apresentaram um maior número dessas células em relação aos pacientes reativados, sugerindo um efeito protetor dessas células após o transplante.

De fato, foi demonstrado que as células de memória do tipo B1 são capazes de promover a depuração de células apoptóticas e suprimir respostas inflamatórias através da produção de IL-10. Além disso, os autores observaram que frequência dessas células diminui com a idade, o que pode contribuir para a suscetibilidade à doença (Griffin et al. 2012). No entanto, a literatura ainda carece de estudos mais detalhados sobre a funcionalidade dessas células no contexto do transplante e da autoimunidade.

Esses achados sugerem que após o TACTH ocorre um aumento da atividade medular e, conseqüentemente, o compartimento de células B se regenera predominantemente a partir de CTHs autólogas transplantadas, e não de células B residuais. Além disso, a renovação do *pool* de células B naíve indica um aumento da diversidade imunológica pela renovação do repertório de BCRs, corroborando estudos anteriores do nosso grupo (Alexander et al. 2009; Arruda et al. 2018b; Farge et al. 2005).

8.3 Cinética de reconstituição das células B reguladoras

As Bregs são essenciais para a manutenção da homeostasia e tolerância imunológica, devido a sua capacidade de suprimir respostas imunes, principalmente através da produção de IL-10. Estas células correspondem a menos de 10% do total de células B em indivíduos saudáveis e apresentam imunofenótipos distintos. (Mauri and Menon 2017; Yanaba et al. 2009).

Além disso, devido a ausência de um fator de transcrição específico dessas células, como o Foxp3 nas Tregs, diversos marcadores de superfície em associação com a detecção de IL-10 intracelular têm sido usados para identificação das Bregs, sendo os fenótipos CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ os mais caracterizados até o momento (Iwata et al. 2011; Mauri and Menon 2017; Rosser and Mauri 2015). De fato, anormalidades funcionais e/ou numéricas dessas células têm sido associadas com a patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo a

ES (Aravena et al. 2017; Arruda et al. 2018b; Matsushita et al. 2016; Mavropoulos et al. 2017; Mavropoulos et al. 2016). Contudo, ainda não está claro se a autoimunidade causa as anormalidades encontradas no compartimento de Bregs, ou vice-versa.

Neste contexto, o presente estudo avaliou a reconstituição das subpopulações de Bregs $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ (Bregs transicionais) e $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ (B10) após o TACTH, e a correlação destas com os parâmetros clínicos. Observamos que as Bregs transicionais foram eliminadas durante o regime de condicionamento e, nos períodos pós-transplante, apresentou números absolutos superiores aos encontrados antes do transplante, sugerindo que essas células constituem uma subpopulação de Bregs naturais recém-emigrantes da medula.

Em contraste, os números absolutos de células B10 ao longo do seguimento pós-transplante foram similares ao período pré-transplante, indicando que essas células são capazes de resistir ao regime de condicionamento e devem exercer funções reguladoras no ambiente linfopênico.

Além disso, demonstramos que o TACTH é capaz de recuperar a capacidade supressora das Bregs. As Bregs transicionais apresentaram um aumento da produção de IL-10 persistente, que manteve-se ao longo do seguimento. No entanto, as células B10 apresentaram um aumento transiente nos 6 primeiros meses pós-transplante. É importante salientar que as células $CD19^+$ totais também aumentaram a capacidade de produzir IL-10, reforçando o papel crucial que as células B desempenham nos períodos iniciais após o TACTH.

O aumento da produção de IL-10 pode ser explicado pelo aumento da fosforilação das vias de sinalização ERK1/2 e p38MAPK observado após o transplante. Estudos tem demonstrado que a fosforilação das proteínas ERK1/2, p38MAPK e STAT3 desempenha um papel importante na produção de IL-10 (Avery et al. 2010; Masson et al. 2015). Recentemente, Mavropoulos e colaboradores observaram que Bregs de pacientes com ES apresentavam capacidade diminuída de produzir IL10 após estímulo via TLR9 devido a defeitos na fosforilação das vias p38MAPK e STAT3 (Mavropoulos et al. 2016).

Além disso, Mion e colaboradores demonstram que a fosforilação da via p38MAPK é essencial para a expressão do gene *IL10* por células B após estímulo via TLR9 (Mion et al. 2014). Posteriormente, Liu e colaboradores observaram que o bloqueio da via ERK1/2 inibia a produção de IL-10 via sinalização por TLR (Liu et al.

2014). Vale ressaltar que o transplante não foi capaz de promover mudanças nos níveis de fosforilação do STAT3 após estímulo via TLR9. Nossa hipótese, é que o aumento da fosforilação das vias p38MAPK e ERK1/2 regula negativamente a via de sinalização por STAT3 nas células B, assim como já foi demonstrado em outras células (Jain et al. 1998; Xue et al. 2014).

Recentemente, Aravena e colaboradores observaram que as Bregs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transicionais de pacientes com ES falham em suprimir a proliferação de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e TCD4⁺ TNF- α ⁺. Neste contexto, observamos que após o TACTH, as Bregs transicionais adquirem ou readquirem a capacidade de inibir a proliferação de células T CD4⁺ IFN- γ e TCD4⁺ TNF- α ⁺ autólogas (Aravena et al. 2017). A recuperação da capacidade imunossupressora das Bregs transicionais constitui um efeito significativo do TACTH para reestabelecimento da tolerância imunológica e no desfecho clínico favorável dos pacientes. De fato, a frequência dessas células correlacionou negativamente com o mRss.

Além disso, observamos que os pacientes que sofreram reativação da doença apresentaram uma frequência diminuída de Bregs transicionais nos períodos pré- e pós-transplante, indicando que a reconstituição quantitativa e qualitativa de Bregs transicionais está diretamente associada a desfechos clínicos favoráveis e de longo prazo. Resultados semelhantes foram obtidos em pacientes com LES após tratamento com rituximab, corroborando nossos achados (Palanichamy et al. 2009).

8.4 Diminuição do perfil pró-fibrótico das células B após o TACTH

Outra característica marcante das células B de pacientes com ES é a capacidade de produzir grandes quantidades de IL-6 e TGF- β , duas das mais importantes citocinas pró-fibróticas (Taher et al. 2017).

A IL-6 desempenha um papel fundamental nas respostas de fase aguda, através da regulação da proliferação, ativação e diferenciação celular (Mahmood et al. 2015). Além disso, a IL-6 é capaz de induzir a produção de colágeno por fibroblastos da derme (Sundararaj et al. 2009). De fato, pacientes com ES apresentam níveis séricos de IL-6 elevados. Adicionalmente, a terapia utilizando tocilizumab (anti-IL6) tem se mostrado eficaz em promover melhora clínica (Khanna et al. 2019; Mauri et al. 2017).

O TGF- β é considerado a principal citocina pró-fibrótica, mas também desempenha importantes funções imunomoduladoras. Essa citocina regula a inflamação, diferenciação epitelial, proliferação celular e processo de cicatrização (Sargent et al. 2010). Pacientes com ES apresentam altos níveis de TGF- β no soro, os quais correlacionam positivamente com a gravidade da doença (Fukasawa et al. 2017). Além disso, um estudo piloto utilizando fresolimumab (anti-TGF- β) mostrou-se eficaz na redução de fibrose na pele (Rice et al. 2015)

Neste contexto, nós observamos que o TACTH é capaz de promover uma diminuição transiente da produção de TGF- β 1 por células B, ao mesmo tempo que promove uma diminuição persistente da produção de IL-6 por essas células. Estes resultados sugerem que o aumento da produção de IL-10, que ocorre concomitantemente com diminuição de IL-6, representa um mecanismo que atua de maneira sinérgica para diminuição da fibrose tecidual e para recuperação da tolerância imunológica. Em conjunto, nossos resultados indicam que a diminuição da fibrose observada nos pacientes com ES após o TACTH deve-se à recuperação do balanço homeostático do compartimento de células B.

Corroborando essa hipótese, Matsushita e colaboradores (2018) demonstraram em modelo de fibrose pulmonar induzido por bleomicina, que a fibrose pulmonar e cutânea foi atenuada em camundongos deficientes de células B produtoras de IL-6, porém exacerbada em camundongos deficientes de células B produtoras de IL-10. Além disso, a superexpressão de IL-6 leva a geração espontânea de centros-germinativos e consequente exacerbação da autoimunidade em modelo murino de LES (Arkatkar et al. 2017). Na AR, a exposição simultânea a IL-6, IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias pode prejudicar a cinética de desenvolvimento e função supressora das Bregs transicionais, promovendo sua diferenciação em células B maduras (Flores-Borja et al. 2013).

8.5 Análise de expressão gênica

No presente estudo, encontramos uma alta similaridade de expressão dos 84 genes analisados, entre os períodos pré- e 180 dias pós-TACTH. No entanto, 360 dias após o transplante houve uma mudança significativa no perfil de expressão gênica em comparação ao período pré-transplante. Nossa hipótese é que esta mudança ocorreu devido a reativação tímica e consequente exportação de novas

células T para a periferia, tendo em vista que a nossa análise foi feita em *pool* de PBMCs. Embora a involução tímica seja um processo fisiológico inevitável durante a vida, a plasticidade do tecido tímico permite que esse processo seja interrompido ou até mesmo revertido (Toubert et al. 2012). De fato, diversos estudos têm demonstrado que a recuperação da timopoiese em pacientes com doenças autoimunes submetidos a regimes de imunoablação, seguido do TACTH, está associada a melhora clínica de pacientes com EM e ES (Arruda et al. 2018b; Farge et al. 2017a; Muraro et al. 2014; Muraro et al. 2005).

Dos 13 genes diferencialmente expressos, 7 foram regulados negativamente, dos quais destacamos os genes codificadores das citocinas IL-6, IL-22 e IFN- γ , e da proteína MD2. Os outros 5 genes foram superexpressos, dos quais destacamos o TLR9 e o CD40L.

Recentemente, Brembilla e colaboradores, ao analisarem biópsias de pele de 15 pacientes com ES, encontraram altos níveis de IL-22 quando comparado à pele de indivíduos saudáveis (Brembilla et al. 2016). Os autores demonstram que a IL-22 aumenta a ação do TNF- α nos fibroblastos e queratinócitos, resultando em uma maior produção de mediadores pró-inflamatórios pelos fibroblastos dérmicos. Além disso, Barone e colaboradores demonstraram que a IL-22 regula a produção de quimiocinas e a montagem de órgãos linfoides terciários em mucosas de modelo murino de autoimunidade induzida por vírus, evidenciando uma ligação entre infecção da mucosa, recrutamento de células B e autoimunidade humoral (Barone et al. 2015). Zhang e colaboradores observaram que a infiltração de células B no pulmão de pacientes com tuberculose está associada ao aumento de expressão de IL-22 e IL-17 (Zhang et al. 2011). Em conjunto, esses dados indicam que a diminuição de IL-22 pós-transplante pode favorecer um desfecho clínico favorável dos pacientes com ES.

Estudos recentes têm demonstrado o papel do eixo TLR4/MD-2 na manutenção e ampliação da fibrose. Como a sinalização desregulada de TLR4, induzida pela geração descontrolada e acúmulo persistente de DAMPs, está implicada em doenças inflamatórias crônicas e autoimunidade, estratégias para inibição seletiva da sinalização via TLR4 pode contribuir para o controle dessas condições (Gao et al. 2017; West et al. 2006). De fato, tem sido demonstrado que DAMPs específicos estão aumentados na pele e nos pulmões de pacientes com ES e, em grande parte, co-localizados com miofibroblastos que expressam TLR4

(Bhattacharyya et al. 2013). Em camundongos, o silenciamento de genes que expressam os DAMPs fibronectina-EDA e tenascina-C resultou em atenuação da fibrose tecidual (Bhattacharyya et al. 2016; Bhattacharyya et al. 2014). Neste contexto, a diminuição da expressão do gene MD-2 após o TACTH pode interferir na sinalização via TLR4 de células autorreativas, diminuindo a capacidade efetora das mesmas.

A regulação negativa do gene *IFNG* nas PBMCs dos pacientes com ES após o transplante indica uma diminuição do status inflamatório. Paralelamente, a diminuição da expressão do gene que codifica a IL-6 corrobora com os resultados observados nos experimentos de estimulação *in vitro*, em que demonstramos uma diminuição da produção de IL-6 por células B. Conforme discutido anteriormente, a diminuição de IL-6 deve contribuir para remissão clínica da doença, principalmente do acometimento cutâneo, após o TACTH.

Além disso, o aumento da expressão do TLR9 e do CD40L pode estar relacionado a recuperação da capacidade supressora das Bregs, uma vez que essas duas moléculas estão intimamente envolvidas na sinalização para produção de IL-10 (Blair et al. 2010).

A modulação desses 13 genes, em 84 analisados, representa uma parte ínfima de todos os genes que devem ser modulados pela terapia se avaliarmos o transcriptoma completo dos pacientes com ES antes e após o TACTH. No entanto, a modulação desses genes após o transplante já indica uma diminuição da inflamação, da autoimunidade humoral e da fibrose e, por outro lado, um aumento da função supressora de Bregs, que certamente contribuem para melhora clínica dos pacientes.

8.6 Considerações finais

Nosso trabalho contribuiu para responder algumas questões e lacunas sobre o papel das células B no TACTH em pacientes com ES. Conforme revisamos num trabalho recente do grupo, a maioria dos mecanismos de ação do TACTH é comum para as doenças autoimunes que são atualmente tratadas com essa terapia (Malmegrim 2018). Portanto, os novos mecanismos imunológicos mediados por células B que descrevemos aqui, devem acontecer também em pacientes com

outras doenças autoimunes transplantados, entretanto, isso deve ser validado em estudos posteriores.

Em um trabalho anterior do nosso grupo, mostramos que após o TACTH ocorre um aumento da função tímica e medular em pacientes com ES, o que implica numa renovação do *pool* de células T e B naive nos pacientes, principalmente os respondedores (Arruda 2018). Nesse presente trabalho, mostramos que após o TACTH ocorre a recuperação da capacidade supressora de subpopulações de Bregs, a diminuição da produção de citocinas pró-fibróticas por células B maduras e a modulação da expressão de genes relacionados a inflamação e autoimunidade em células periféricas.

Conclusão

9. Conclusão

Os resultados obtidos nesse trabalho confirmaram nossa hipótese inicial de que os pacientes com ES apresentam, logo após o TACTH, uma diminuição do número de células B de memória e um aumento do número e função de subpopulações de células B reguladoras. Além disso, as Bregs transitórias readquiriram a capacidade de suprimir a proliferação de células T CD4⁺, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células. Por outro lado, a produção de citocinas pró-fibróticas por células B maduras diminuiu após o transplante. Observamos também uma modulação da expressão de 13 genes relacionados a resposta inflamatória e autoimunidade 360 dias pós-TACTH, em comparação ao período pré-transplante. Em conjunto, sugerimos que todos esses mecanismos atuam sinergicamente no restabelecimento da autotolerância imunológica e diminuição da inflamação e fibrose nos pacientes com ES que respondem satisfatoriamente ao TACTH. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuíram para aumentar o conhecimento sobre a reconstituição numérica e funcional do compartimento de células B após o TACTH em pacientes com ES. Este conhecimento poderá futuramente contribuir para melhorias do protocolo clínico de TACTH para ES e outras doenças autoimunes.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abrahamsson S, Muraro PA. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity*. 2008;41(8):577–84.
- Alexander T, Farge D, Badoglio M, Lindsay JO, Muraro PA, Snowden JA. Hematopoietic stem cell therapy for autoimmune diseases – Clinical experience and mechanisms. *J. Autoimmun. Elsevier*; 2018;92(June):35–46.
- 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 Jan 1;113(1):214–23.
- Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015;(April):15002.
- Aravena O, Ferrier A, Menon M, Mauri C, Aguillón JC, Soto L, et al. TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res. Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2017;1–13.
- Arkatkar T, Du SW, Jacobs HM, Dam EM, Hou B, Buckner JH, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2017;214(11):3207–17.
- Arruda LCM, Lima-Júnior JR, Clave E, Moraes DA, Douay C, Fournier I, et al. Homeostatic proliferation leads to telomere attrition and increased PD-1 expression after autologous hematopoietic SCT for systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant*. 2018a;;1–9.
- Arruda LCM, Malmegrim KCR, Lima-Júnior JR, Clave E, Dias JBE, Moraes DA, et al. Immune rebound associates with a favorable clinical response to autologous HSCT in systemic sclerosis patients. *Blood Adv.* 2018b Jan 23;2(2):126–41.
- Arruda LCM, Oliveira MC, Malmegrim KCR, Gluckman E, Farge D. Autologous

hematopoietic cell transplants for autoimmune diseases: Specific diseases and controversies. *Hematop. Cell Transplants*. 2017;535–51.

Arruda LCMCM, Clave E, Moins-Teisserenc H, Douay C, Farge D, Toubert A. Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Curr. Res. Transl. Med. Elsevier Masson SAS*; 2016a;64(2):107–13.

Arruda LCMM, Azevedo JTC De, Oliveira GLV De, Scortegagna GT, Rodrigues ES, Palma PVBB, et al. Immunological correlates of favorable long-term clinical outcome in multiple sclerosis patients after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Immunol. Elsevier Inc.*; 2016b;169:47–57.

Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: Points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):589–98.

Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med*. 2010;207(1):155–71.

Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int. Immunol*. 2015;27(10):487–93.

Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Masse I, Grigore EI, Arruda LCM, et al. Transforming growth factor- β increases interleukin-13 synthesis via GATA-3 transcription factor in T-lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2015;17(1):1–15.

Baraut J, Grigore EI, Jean-Louis F, Khelifa SH, Durand C, Verrecchia F, et al. Peripheral blood regulatory T cells in patients with diffuse systemic sclerosis (SSc) before and after autologous hematopoietic SCT: a pilot study. *Bone Marrow Transplant. Nature Publishing Group*; 2014;49(3):349–54.

Barone F, Nayara S, Camposa J, Cloakea T, Withers DR, Toellner KM, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2015;112(35):11024–9.

Barsotti NS, Almeida RR, Costa PR, Barros MT, Kalil J, Kokron CM. IL-10-Producing regulatory B cells are decreased in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One*. 2016;11(3):93–100.

Van Bekkum DW. Stem cell transplantation in experimental models of autoimmune disease. *J. Clin. Immunol.* 2000;20(1):10–6.

Van Bekkum DW, Bohre EPM, Houben PFJ, Knaan-Shanzer S. Regression of adjuvant-induced arthritis in rats following bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989;86(24):10090–4.

Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor- β responses: A novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am. J. Pathol.* 2013;182(1):192–205.

Bhattacharyya S, Midwood KS, Yin H, Varga J. Toll-like receptor-4 signaling drives persistent fibroblast activation and prevents fibrosis resolution in scleroderma. *Adv. Wound Care*. 2017;6(10):356–69.

Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S, et al. FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through toll-like receptor signaling. *Sci. Transl. Med.* 2014;6(232).

Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, Feng G, Wu M, Zhou X, et al. Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group; 2016;7:1–14.

Bhattacharyya S, Wei J, Tourtellotte WG, Hinchcliff M, Gottardi CG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: common and unique pathobiology. *Fibrogenes. Tissue Repair.* BioMed Central Ltd; 2012;5 Suppl(Suppl 1):1–6.

Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010;32(1):129–40.

Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-Antigen Presentation

by CD1d + B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2012;36(3):477–90.

Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2010;40(10):2686–91.

Brembilla NC, Dufour AM, Alvarez M, Hugues S, Montanari E, Truchetet ME, et al. IL-22 capacitates dermal fibroblast responses to TNF in scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;

Brink MRM Van Den, Velardi E, Perales M. Immune reconstitution following stem cell transplantation. 2015;215–9.

Brkic Z, Van Bon L, Cossu M, Van Helden-Meeuwsen CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type i signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;75(8):1567–73.

Budeus B, De Reynoso SS, Przekopowicz M, Hoffmann D, Seifert M, Küppers R, et al. Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112(38):E5281–9.

Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefosky D, Balabanov R, Katsamakakis G, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol.* Elsevier Ltd; 2009;8(3):244–53.

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.* Elsevier Ltd; 2013;381(9872):1116–24.

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.* Elsevier Ltd; 2011;378(9790):498–506.

Burt RK, Shah SJ, Dill K, Grant T, Gheorghiade M, Schroeder J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation has better outcomes than conventional therapies in patients with rapidly progressive systemic sclerosis. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2018;378(1):S48–56.

Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG Drives Human Transitional B Cells to Terminal Differentiation and Production of Natural Antibodies. *J. Immunol*. 2008;180(2):800–8.

Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}) . *Annu. Rev. Immunol*. 2011;29(1):621–63.

Cui D, Zhang L, Chen J, Zhu M, Hou L, Chen B, et al. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. *Clin. Exp. Med*. Springer Milan; 2015;15(3):285–92.

Danieli MG, Calcabrini L, Calabrese V, Marchetti A, Logullo F, Gabrielli A. Intravenous immunoglobulin as add on treatment with mycophenolate mofetil in severe myositis. *Autoimmun. Rev*. 2009.

Deleamarre EM, Broek T Van Den, Mijnheer G, Meerding J, Wehrens EJ, Olek S, et al. Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional renewal and TCR diversification of regulatory T cells. *Blood*. 2016;127(1):91–102.

Denton CP, Khanna D. Seminar Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017;

Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat. Immunol*. 2018.

Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol*. 2007;178(10):6092–9.

Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis: Recent insights. *Jt. Bone Spine*. Elsevier Masson SAS; 2015;82(3):148–53.

Elhai M, Distler O, Smith V, Matucci-Cerinic M, Alegre-Sancho JJ, Truchetet M-E, et al. OP0142 Rituximab in systemic sclerosis : safety and efficacy data from the eustar network. 2018;(June):122.1-122.

Elhai M, Hoffmann-Vold AM, Avouac J, Pezet S, Cauvet A, Leblond A, et al. Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(6):972–82.

Fang F, Goncalves Marangoni R, Zhou X, Yang Y, Ye B, Shangguang A, et al. Toll-like Receptor 9 Signaling Is Augmented in Systemic Sclerosis and Elicits Transforming Growth Factor- β -Dependent Fibroblast Activation. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(8):1989–2002.

Farge D, Arruda LCM, Brigant F, Clave E, Douay C, Marjanovic Z, et al. Long-term immune reconstitution and T cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. *J. Hematol. Oncol. Journal of Hematology & Oncology*; 2017a;:1–9.

Farge D, Burt RK, Oliveira M-C, Mousseaux E, Rovira M, Marjanovic Z, et al. Cardiopulmonary assessment of patients with systemic sclerosis for hematopoietic stem cell transplantation: recommendations from the European Society for Blood and Marrow Transplantation Autoimmune Diseases Working Party and collaborating partners. *Bone Marrow Transplant. Nature Publishing Group*; 2017b;52(11):1495–503.

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.

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.

Fleischmajer R. Skin Capillary Changes in Early Systemic Scleroderma. *Arch. Dermatol*. 1976;112(11):1553.

Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum*. 1977;20(4):975–84.

Fleming JN, Schwartz SM. The Pathology of Scleroderma Vascular Disease. *Rheum*.

Dis. Clin. North Am. 2008;34(1):41–55.

Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* 2013;5(173):173ra23.

Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Blair PA, Noren LY, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *J. Immunol. Elsevier Inc.*; 2014;184(3):1–8.

François A, Chatelus E, Wachsmann D, Sibilia J, Bahram S, Alsaleh G, et al. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15(5):R168.

Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, et al. Contribution of Soluble Forms of Programmed Death 1 and Programmed Death Ligand 2 to Disease Severity and Progression in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(9):1879–90.

Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine. Elsevier Ltd*; 2011;56(3):544–9.

Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA. Interleukin-13-producing CD8⁺ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):236–46.

Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. *Front. Physiol.* 2017;8(JUL).

Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B Cell Antigen in Lymph Nodes. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29(1):215–33.

Gordon JK, Domsic RT. Clinical Trial Design Issues in Systemic Sclerosis: an Update. *Curr. Rheumatol. Rep. Current Rheumatology Reports*; 2016;18(38):1–8.

Griffin D, Rothstein T, Klinker M, Lundy S, Griffin D, Rothstein T, et al. <Title/>. *Mol. Med.* 2012;18(6):1.

Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *J. Exp. Med.* 2011;208(1):67–80.

Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis-a lethal component of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2014;10(7):390–402.

Hoogen F Van Den, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. SSc_criteria_ARD2013 - Hoogen et al. *Ann. Rheum. Dis.* 2013;72(11):1747–55.

Hussain S, Delovitch TL. Intravenous Transfusion of BCR-Activated B Cells Protects NOD Mice from Type 1 Diabetes in an IL-10-Dependent Manner. *J. Immunol.* 2007;179(11):7225–32.

Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530–41.

Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene.* 1998;17(24):3157–67.

Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel A V., Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* Elsevier Inc.; 2018;49(4):725–739.e6.

Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 2012;30(1):531–64.

Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 2011;6:509–37.

Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 1974;251(5475):550–1.

Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis: Unanswered questions.

Front. Immunol. 2015;6(MAR):2–7.

Kelsey PJ, Oliveira M-C, Badoglio M, Sharrack B, Farge D, Snowden JA. Haematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: From basic science to clinical practice. *Curr. Res. Transl. Med.* Elsevier Masson SAS; 2016;64(2):71–82.

Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group; 2015;6:5997.

Khanna D, Tashkin DP, Denton CP, Lubell MW, Vazquez-Mateo C, Wax S. Ongoing clinical trials and treatment options for patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Rheumatol. (United Kingdom)*. 2019;58(4):567–79.

Klein S, Kretz CC, Ruland V, Stumpf C, Haust M, Hartschuh W, et al. Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(8):1475–81.

Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: A twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3902–12.

Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2017;76(8):1327–39.

Kulkarni U, Herrmenau C, Win SJ, Bauer M, Kamradt T. IL-7 treatment augments and prolongs sepsis-induced expansion of IL-10-producing B lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells. *PLoS One*. 2018;13(2):1–14.

van Laar JM, Farge D, Sont JK, Naraghi K, Marjanovic Z, Larghero J, et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Intravenous Pulse Cyclophosphamide in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *JAMA*. 2014;311(24):2490.

Lafyatis R, Kissin E, York M, Farina G, Viger K, Fritzler MJ, et al. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):578–83.

Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Neves P, Shen P, Stervbo U, et al. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol. Rev.* 2010;233(1):146–61.

Li G, Larregina AT, Domsic RT, Stolz DB, Medsger TA, Lafyatis R, et al. Skin-Resident Effector Memory CD8+CD28–T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* Elsevier Ltd; 2017;137(5):1042–50.

Lima-júnior JR, Arruda LCM, Oliveira MC De, Malmegrim KCR. Thymus Transcriptome and Cell Biology. *Thymus Transcr. Cell Biol.* 2019;295–309.

Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TFE, et al. Interleukin 21-induced granzyme b-expressing b cells infiltrate tumors and regulate t cells. *Cancer Res.* 2013;73(8):2468–79.

Liu BS, Cao Y, Huizinga TW, Hafler DA, Toes REM. TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells. *Eur. J. Immunol.* 2014;44(7):2121–9.

Lutter L, Spierings J, van Rhijn-Brouwer FCC, van Laar JM, van Wijk F. Resetting the T Cell Compartment in Autoimmune Diseases With Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Update. *Front. Immunol.* 2018;9(April):767.

Mahmood Z, Muhammad K, Schmalzing M, Roll P, Dörner T, Tony HP. CD27-IgD-memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2015;17(1):1–11.

Malmegrim KCR, de Azevedo JTC, Arruda LCM, Abreu JRF, Couri CEB, de Oliveira GL V., et al. Immunological Balance Is Associated with Clinical Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* 2017;8(February).

Malmegrim KCR, Lima-Júnior JR, Arruda LCM, De Azevedo JTC, De Oliveira GLV,

Oliveira MC. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: From mechanistic insights to biomarkers. *Front. Immunol.* 2018;9(NOV).

Masson D, Bouaziz J, Buanec L, Robin M, Meara AO, Parquet N, et al. CD24^{hi} CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2015;125(11):1830–40.

Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(2):263–7.

Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated Serum BAFF Levels in Patients With Systemic Sclerosis Enhanced BAFF Signaling in Systemic Sclerosis B Lymphocytes. 2006;54(1):192–201.

Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B Cells (B10 Cells) and Regulatory T Cells Have Independent Roles in Controlling Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Initiation and Late-Phase Immunopathogenesis. *J. Immunol.* 2010;185(4):2240–52.

Matsushita T, Kobayashi T, Mizumaki K, Kano M, Sawada T, Tennichi M, et al. BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance. *Sci. Adv.* 2018;4(7):1–13.

Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: Evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):1953–62.

Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: Developments and controversies. *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2010;6(11):636–43.

Mauri C, Bosma A, Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in systemic sclerosis: Results from the open-label period of a phase II randomised controlled trial (faSScinate). *Front. Immunol.* Nature Publishing Group; 2017;29(1):1–7.

Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *J. Exp. Med.* 2003;197(4):489–501.

Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 2017;127(3):772–9.

Mavropoulos A, Liaskos C, Simopoulou T, Bogdanos DP, Sakkas LI. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells), IL-17 + T cells and autoantibodies in systemic sclerosis. *Clin. Immunol. Elsevier Inc.*; 2017;184:26–32.

Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(2):494–504.

Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity. The Authors*; 2016;44(3):683–97.

Mion F, Tonon S, Toffoletto B, Cesselli D, Pucillo CE, Vitale G. IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation. *Mol. Immunol. Elsevier Ltd*; 2014;62(2):266–76.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002;

Molnarfi N, Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Juillard C, Lalive PH. Activation of human B cells negatively regulates TGF- β 1 production. *J. Neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation*; 2017;1–12.

Mora GF. Systemic sclerosis: Environmental factors. *J. Rheumatol.* 2009;36(11):2383–96.

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.

Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2017;13(7):391–405.

Muraro PA, Robins H, Malhotra S, Howell M, Phippard D, Desmarais C, et al. Brief

report T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2014;124(3):1168–72.

Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 1974;113(6):1716–25.

Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD, Chana P, Elgueta R, Dodd PC, et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4(+)T-cell responses. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*; 2016;6(January):20044.

O'Sullivan BJ, Yekollu S, Ruscher R, Mehdi AM, Maradana MR, Chidgey AP, et al. Autoimmune-mediated thymic atrophy is accelerated but reversible in RelB-deficient mice. *Front. Immunol.* 2018;9(MAY).

Oliveira MC, Labopin M, Henes J, Moore J, Papa ND, Cras A, et al. Does ex vivo CD34+ positive selection influence outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients? *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(4):501–5.

Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. *J. Immunol.* 2009;182(10):5982–93.

Del Papa N, Onida F, Zaccara E, Saporiti G, Maglione W, Tagliaferri E, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation has better outcomes than conventional therapies in patients with rapidly progressive systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant. Nature Publishing Group*; 2016;(January):1–6.

Papp G, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scand. J. Rheumatol.* 2011;40(3):205–10.

Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite AE. Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Inflamm. Res.* 2011;4(1):105–25.

Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of

systemic sclerosis. *Front. Immunol.* 2015;6(JUN).

Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J. Pathol.* 1992;166(3):255–63.

Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PLoS One.* 2009;4(6).

Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7(5).

Rangarajan V, Matiasz R, Freed BH. Cardiac complications of systemic sclerosis and management: Recent progress. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2017;29(6):574–84.

Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V.*; 2010;9(5):A311–8.

Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 2015;125(7):2795–807.

Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity. Elsevier Inc.*; 2015;42(4):607–12.

Sakkas LI, Bogdanos DP, Arruda LCM, Malmegrim KCR, Lima-Júnior JR, Clave E, et al. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Clin. Immunol. Elsevier Inc.*; 2015 Jan 23;41(2):15002.

Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez S a, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Immunol.* 2002;168(7):3649–59.

Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S, Varga J, Connolly MK, Chang HY, et al. A TGFB-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma

with increased disease severity. *J. Invest. Dermatol.* Elsevier Masson SAS; 2010;130(3):694–705.

Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1918–27.

Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative Genetic Variation in CD19 Expression Correlates with Autoimmunity. *J. Immunol.* 2000;

Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM, et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2016;30(1):163–72.

Saze Z, Schuler P, Hong C, Cheng D. Adenosine production by human B cells and B cell–mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 2013;122(July):9–19.

Simon D, Balogh P, Bognár A, Kellermayer Z, Engelmann P, Németh P, et al. Reduced non-switched memory B cell subsets cause imbalance in B cell repertoire in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2016;(14):1–7.

Snowden JA, Badoglio M, Labopin M, Giebel S, McGrath E, Marjanovic Z, et al. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Adv.* 2017;1(27):2742–55.

Snowden JA, Panés J, Alexander T, Allez M, Ardizzone S, Dierickx D, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) in severe Crohn's Disease: a review on behalf of ECCO and EBMT. *J. Crohns. Colitis.* 2018;(March):1–13.

Snowden JA, Pearce RM, Lee J, Kirkland K, Gilleece M, Veys P, et al. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in severe autoimmune diseases: Analysis of UK outcomes from the British Society of Blood and Marrow Transplantation (BSBMT) data registry 1997-2009. *Br. J. Haematol.* 2012;157(6):742–6.

Staun-Ram E, Miller A. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol.* Elsevier Inc.; 2017;184:11–25.

Stifano G, Affandi AJ, Mathes AL, Rice LM, Nakerakanti S, Nazari B, et al. Chronic Toll-like receptor 4 stimulation in skin induces inflammation, macrophage activation, transforming growth factor beta signature gene expression, and fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* 2014;16(4):1–13.

Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(1):35–47.

Sullivan KM, Muraro P, Tyndall A. Hematopoietic Cell Transplantation for Autoimmune Disease: Updates from Europe and the United States. *Biol. Blood Marrow Transplant.* Elsevier Ltd; 2010;16(1):S48–56.

Sundararaj KP, Samuvel DJ, Li Y, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, Huang Y. Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: Cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.* 2009;

Swart JF, Delemarre EM, Wijk F Van, Boelens J, Kuball J, Laar JM Van, et al. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017;13(4):244–56.

Taher TE, Bystrom J, Ong VH, Isenberg DA, Renaudineau Y, Abraham DJ, et al. Intracellular B Lymphocyte Signalling and the Regulation of Humoral Immunity and Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*; 2017;

Thibult M, Mamessier E, Gertner-dardenne J, Pastor S. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. 2012;25(2):129–37.

Thiebaut M, Launay D, Rivière S, Mahévas T, Bellakhal S, Hachulla E, et al. Efficacy and safety of rituximab in systemic sclerosis: French retrospective study and literature review. *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V*; 2018;17(6):582–7.

Ticha O, Moos L, Wajant H, Bekeredjian-Ding I. Expression of tumor necrosis factor receptor 2 characterizes TLR9-driven formation of interleukin-10-producing B cells. *Front. Immunol.* 2018;8(JAN):1–14.

Todeschini M, Cortinovis M, Perico N, Poli F, Innocente A, Cavinato RA, et al. In Kidney Transplant Patients, Alemtuzumab but Not Basiliximab/Low-Dose Rabbit Anti-Thymocyte Globulin Induces B Cell Depletion and Regeneration, Which Associates with a High Incidence of De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibody Development. *J. Immunol.* 2013;191(5):2818–28.

Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: Never say never again. *Tissue Antigens.* 2012;79(2):83–9.

Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2010;6(8):453–60.

Tsokos GC. B cells, be gone - B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(25):2546–8.

Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, et al. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):4002–7.

Tyndall A, Passweg J, Gratwohl A. Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000. *Ann. Rheum. Dis.* 2001.

Van De Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;131(4):1204–12.

Victoria GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell.* Elsevier Ltd; 2010;143(4):592–605.

Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* Elsevier Ltd; 2013;24(3):203–15.

Walker UA, Saketkoo LA, Distler O. Haematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis. *RMD open.* 2018;4(1):e000533.

Wang X, Wang G, Wang Z, Liu B, Han N, Li J, et al. PD-1-expressing B cells suppress CD4 + and CD8 + T cells via PD-1/PD-L1-dependent pathway. *Mol. Immunol. Elsevier*; 2019;109(February):20–6.

Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 2007;178(10):6624–33.

Weiner GJ. Rituximab: Mechanism of action. *Semin. Hematol.* 2010;47(2):115–23.

West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006;22(1):409–37.

Wigley FM, Flavahan NA. Raynaud's Phenomenon. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(6):556–65.

Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996;184(6):2271–8.

Woodland RT, Schmidt MR. Homeostatic proliferation of B cells. 2005;17:209–17.

Wynn T a. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(8):583–94.

Xue P, Zhao Y, Liu Y, Yuan Q, Xiong C, Ruan J. A novel compound RY10-4 induces apoptosis and inhibits invasion via inhibiting STAT3 through ERK-, p38-dependent pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Chem. Biol. Interact. Elsevier Ireland Ltd*; 2014;209(1):125–34.

Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J. Immunol.* 2009;182(12):7459–72.

Yang M, Sun L, Wang S, Ko K-H, Xu H, Zheng B-J, et al. Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *J. Immunol.* 2010;184(7):3321–5.

Yehudai D, Snir A, Peri R, Halasz K, Haj T, Odeh M, et al. B Cell-Activating Factor Enhances Interleukin-6 and Interleukin-10 Production by ODN-Activated Human B Cells. *Scand. J. Immunol.* 2012;76(4):371–7.

Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil AM. How B cells capture, process and present antigens: A crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group; 2013;13(7):475–86.

Zhang M, Wang Z, Graner MW, Yang L, Liao M, Yang Q, et al. B cell infiltration is associated with the increased IL-17 and IL-22 expression in the lungs of patients with tuberculosis. *Cell. Immunol.* Elsevier Inc.; 2011;270(2):217–23.

Apêndice

APÊNDICE 1 – Estratégia de *gating* para a avaliação de subpopulações de células B convencionais

Apêndice 1 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(C)** A gate R3 foi desenhada na população de células B convencionais com base na expressão dos marcadores CD27 e IgD, CD19⁺IgD⁺CD27⁻ (naïve), CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (memória sem switch de classe), CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (memória com switch de classe), CD19⁺IgD⁻CD27^{hi} (plasmócito), CD19⁺IgD⁻CD27⁻ (duplo negativa). **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células B convencionais com base na expressão dos marcadores CD38 e IgD CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm1, naïve), CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2, naïve ativada), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁺ (Bm2', pré centro germinativo), CD19⁺CD38^{hi}IgD⁻ (Bm3+4, centroblasto+centrócito), CD19⁺CD38⁺IgD⁻ (early Bm5, memória recente) e CD19⁺CD38⁻IgD⁻ (late Bm5, memória tardia). **(E)** A gate R5 foi desenhada na população de células B convencionais CD19⁺PD1⁺.

APÊNDICE 2 – Estratégia de *gating* para a avaliação de subpopulações de células B do tipo B1

Apêndice 2 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos CD20⁺, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(C)** A gate R3 foi desenhada na população de células B do tipo B1 CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD69⁻.

APÊNDICE 3 – Estratégia de *gating* para a avaliação de subpopulações de células B reguladoras

Apêndice 3 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos CD20⁺, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(C)** A gate R3 foi desenhada na população de células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (célula B reguladora transicional), CD19⁺CD24^{hi}CD38⁻, CD19⁺CD24⁻CD38^{hi}. **(D)** A gate R3 foi desenhada na população de células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺.

APÊNDICE 4 – Estratégia de *gating* para a avaliação da produção de citocinas por células B

Apêndice 4 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células mortas que foram excluídas utilizando o marcador de viabilidade BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (R2). **(C)** A gate R3 foi desenhada para a exclusão de doublets utilizando o dot plot FSC-H vs FSC-A, representado pela região de singlets. **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(E)** A gate R5 foi desenhada na população CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. **(F)** A gate R6 foi desenhada na população CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺. **(G)** A gate R7 foi desenhada na população de células B IL10⁺, TGF-β1⁺ ou IL6⁺.

APÊNDICE 5 – Estratégia de *gating* para a avaliação da fosforilação de proteínas em células B

Apêndice 5 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células mortas que foram excluídas utilizando o marcador de viabilidade BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (R2). **(C)** A gate R3 foi desenhada para a exclusão de doublets utilizando o dot plot FSC-H vs FSC-A, representado pela região de singlets. **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(E)** A gate R5 foi desenhada para identificação das células B CD19⁺p38MAPK⁺, CD19⁺STAT3⁺ ou CD19⁺ERK⁺.

APÊNDICE 6 – Estratégia de *gating* nos ensaios depleção das células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} nas amostras de PBMCs

Apêndice 6 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células mortas que foram excluídas utilizando o marcador de viabilidade BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (R2). **(C)** A gate R3 foi desenhada para a exclusão de doublets utilizando o dot plot FSC-H vs FSC-A, representado pela região de singlets. **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células B totais CD19⁺. **(E)** A gate R5 foi desenhada na população CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. **(F)** A gate R6 foi desenhada na população de células B reguladoras CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} depletadas.

APÊNDICE 7 – Estratégia de *gating* para a avaliação da produção de citocinas por células T

Apêndice 7 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células mortas que foram excluídas utilizando o marcador de viabilidade BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (R2). **(C)** A gate R3 foi desenhada para a exclusão de doublets utilizando o dot plot FSC-H vs FSC-A, representado pela região de singlets. **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células T CD4⁺. **(E)** A gate R5 foi desenhada na população de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ ou TNF- α ⁺.

APÊNDICE 8 – Estratégia de *gating* para a avaliação da proliferação de células T

Apêndice 8 – (A) A gate R1 foi desenhada na população de linfócitos totais, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC ou Forward Scatter) e complexidade interna (SSC ou Side Scatter). Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra, que então foram analisadas utilizando os softwares Cellquest (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) e FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). **(B)** A gate R2 foi desenhada na população de células mortas que foram excluídas utilizando o marcador de viabilidade BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (R2). **(C)** A gate R3 foi desenhada para a exclusão de doublets utilizando o dot plot FSC-H vs FSC-A, representado pela região de singlets. **(D)** A gate R4 foi desenhada na população de células T CD4⁺Ki67⁺.

APÊNDICE 9 – Esquema geral dos estágios de desenvolvimento das subpopulações de células B convencionais, baseado na expressão dos marcadores IgD e CD27.

Apêndice 9 – De acordo com esse modelo células B naïve são definidas como $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$. Células B de memória que não fizeram a troca da cadeia pesada da imunoglobulina ($\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ sem mudança/"switch" de classe), estas por sua vez podem perder a expressão de ambos os marcadores e se tornarem $\text{CD27}^-\text{IgD}^-$ (duplo negativa) ou após entrarem em contato com antígenos passam pelo centro germinativo e realizam a mudança de isotipo ($\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ com mudança/"switch" de classe), que podem ser células de memória central ou plasmablastos ($\text{IgD}^-\text{CD27}^{\text{hi}}$), ambas com o fenótipo $\text{CD27}^+\text{IgD}^-$ (modificado de Todeschini e colaboradores, 2013).

APÊNDICE 10 – Esquema geral dos estágios de desenvolvimento das subpopulações de células B convencionais, baseado na expressão dos marcadores IgD e CD38.

Apêndice 10 – Esquema geral dos estágios de desenvolvimento das subpopulações de células B convencionais, baseado na expressão dos marcadores IgD e CD38. De acordo com este modelo as células B naíve CD19⁺CD38⁻IgD⁺ (Bm1) após encontro com antígeno tornam-se células B naíve ativadas CD19⁺CD38⁺IgD⁺ (Bm2), que então se desenvolvem em células formadoras de centro-germinativo CD19⁺IgD⁺CD38^{hi} (Bm2'). Estas células, então, diferenciam-se em centroblastos e centrócitos CD19⁺IgD⁻CD38^{hi} (Bm3+4), em células B de memória recente CD19⁺IgD⁻CD38⁺ (early Bm5) e de memória tardia CD19⁺ IgD⁻CD38⁻ (late Bm5). (modificado de Todeschini e colaboradores, 2013).

Anexo

ANEXO - Aprovação do estudo no comitê de ética

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde

Ofício nº. 262/2013/CONEP/CNS/MS

Brasília, 9 de abril de 2013.

A(o) Senhor(a):
Márcia Guimarães Villanova
Coordenador (a) do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP
Campus Universitário Monte Alegre -
14.048-900 - Ribeirão Preto-SP

Assunto: Mudança de Investigador Principal do Centro Coordenador. Registro CONEP 3713: "Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas na esclerose sistêmica: Estudo piloto empregando ciclofosfamida em altas doses, fludarabina e globulina antilinfocitária"

Senhor (a) Coordenador (a),

1. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) recebeu desse Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (1º Centro), a informação de mudança de investigador principal do estudo supracitado, , **passando a responsabilidade do Dr. Júlio César Voltarelli para a Dra Maria Carolina de Oliveira Rodrigues.**
2. A CONEP ratifica a alteração do investigador principal do centro coordenador. Cumpre ressaltar que a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais (Resolução CNS 196/96, item IX.1)
3. Esse CEP (1º Centro) deverá comunicar a troca aos Comitês de Ética em Pesquisa responsáveis pelos demais centros co-participantes do estudo.
4. Sem outro objetivo no momento, com todo apreço, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

ELINA JONAS
SECRETÁRIA-EXECUTIVA DA
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Mem. nº 659/2013
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2013

Ref. Processo HCRP nº 9035/2001

Ilustríssima Senhora
DRª MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA RODRIGUES
Depto. de Clínica Médica
Unidade de Transplante de Medula Óssea

Prezada Senhora,

Encaminho a Vossa Senhoria para ciência, cópia do Ofício nº 262/2013/CONEP/CNS/MS datado de 09/04/2013, no qual a CONEP ratifica a alteração do investigador principal do Projeto de Pesquisa intitulado **"TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS NA ESCLEROSE SISTÊMICA: ESTUDO PILOTO EMPREGANDO CICLOFOSFAMIDA EM ALTAS DOSES, FLUDARABINA E GLOBULINA ANTILINFOCITÁRIA.**

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP e da FMRP-USP