



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS JUNÇÕES
TIGHT NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA

*EVALUATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF TIGHT
JUNCTIONS IN ACUTE GRAFT-VERSUS HOST DISEASE (GVHD)*

CAMPINAS

2019

LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS JUNÇÕES
TIGHT NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA

*EVALUATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF TIGHT
JUNCTIONS IN ACUTE GRAFT-VERSUS HOST DISEASE (GVHD)*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, Área de Concentração Patologia Clínica.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requirements required to obtain the title of PhD in Medical Sciences, Area of Concentration Clinical Pathology.

ORIENTADOR: ERICH VINICIUS DE PAULA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA
E ORIENTADA PELO
PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3368/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C823a Costa, Loredana Nilkenes Gomes da, 1986-
Avaliação de alterações estruturais e funcionais das junções tight na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda / Loredana Nilkenes Gomes da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Erich Vinicius de Paula.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença enxerto-hospedeiro. 2. Transplante de células-tronco hematopoéticas. 3. Proteínas de junções íntimas. I. Paula, Erich Vinicius de, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of structural and functional changes of tight junctions in acute graft-versus host disease (GVHD)

Palavras-chave em inglês:

Graft vs host disease
Hematopoietic stem cell transplantation
Tight junction proteins

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Katia Borgia Pagnano

Raquel Franco Leal

Abrahão Elias Hallack Neto

João Agostinho Machado Neto

Data de defesa: 06-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

ORIENTADOR: ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA**
 - 2. PROFA. DRA. KÁTIA BORGIA BARBOSA PAGNANO**
 - 3. PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL**
 - 4. PROF. DR. ABRAHÃO ELIAS HALLACK NETO**
 - 5. PROF. DR. JOÃO AGOSTINHO MACHADO NETO**
-

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM

DATA DA DEFESA 06/02/2019

DEDICATÒRIA

À toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Erich Vinicius de Paula, pela confiança, por todas as oportunidades de aprendizado, ensinamentos e atenção constante.

Ao Prof. Konradin Metze, por todos os conhecimentos compartilhados, solicitude e valorosa colaboração.

Aos funcionários do setor de Anatomia Patológica e do Serviço de Endoscopia Digestiva do Gastrocentro – Unicamp, em especial a Patologista Rita Carvalho, pela colaboração para a realização deste trabalho.

À Carolina Lima, que deu início a essa linha de pesquisa e que abriu portas essenciais para a construção deste trabalho.

A colaboração das funcionárias Maiara e Lucinha do setor de Microscopia Eletrônica do Hospital de Clínicas – Unicamp.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em especial ao Pesquisador Matheus de Castro Fonseca, pelos ensinamentos, disposição e valiosos auxílios.

Aos funcionários dos laboratórios do Hemocentro – Unicamp, em especial aos funcionários do laboratório de Hemostasia, por toda a disposição e ajuda.

Aos amigos Fábio, Yzabella e Maiara, que tive o prazer de conviver intensamente no início dessa caminhada e que apesar da distância geográfica, continuo com um imenso carinho por todos.

As amizades construídas neste intenso último ano, Ana, Jéssica e Stephanie, vocês foram afetuosas nos momentos de lamúrias e impecáveis nas alegrias.

Aos meus queridos amigos/irmãos, Franciele, Vanessa e Will, pelos conselhos, auxílios, pelos inumeráveis momentos de risadas soltas, pelos aprendizados e por fazerem da nossa relação uma extensão da minha família (e desculpa pelas esperas inacabáveis).

À família que Campinas me presenteou, Fran, Ivo, Marrie e ao aguardado Tomás, muito obrigada por vocês existirem em minha vida.

À minha amiga (e agora afilhada) Pâmella, a mineirinha que tive um imenso prazer de conhecer no ano de cheguei em Campinas e que até hoje permanece em minha vida.

Aos meus pais, Conceição e Antônio Pinto, pelo amor incondicional e dedicação, e a meus irmãos e sobrinhos, por tornarem essa grande família tão especial.

Aos meus sogros, D. Solimar e Sr. Élio, pelo carinho, confiança, conselhos e pelo apoio irrestrito.

Ao meu esposo, Élio Filho, pelo companheirismo, por sua paciência infinita e ser o culpado por minha escolha pela carreira acadêmica.

À Capes pelo auxílio financeiro.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa) é a maior causa de morbidade e mortalidade precoce no transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH). A quebra da barreira epitelial intestinal na fase inicial do TCTH é reconhecida como um evento fisiopatológico crítico para a DECHa. Esta quebra permite a translocação de antígenos da luz intestinal para submucosa e estimula a ativação de linfócitos T do doador, os quais atuam como efetores da resposta imune responsável pela DECHa. O epitélio intestinal mantém sua função de barreira através de complexos juncionais, entre os quais as junções **tight (JT)**. Estes complexos multiproteicos dinâmicos regulam a passagem de solutos, mediante a ativação de vias de sinalização por estímulos do meio externo. Nos últimos anos, as interações proteicas e os estímulos responsáveis pela regulação funcional das JT foram descritos detalhadamente, permitindo a exploração destes mecanismos nas doenças em que a quebra da barreira epitelial apresenta papel relevante. Apesar destes avanços, aspectos fundamentais da fisiopatologia da DECHa, tais como os mecanismos celulares e moleculares que permitem a translocação de antígenos do lúmen intestinal, e os mecanismos efetores finais que resultam em diarreias profusas, ainda não foram elucidados. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo de explorar alterações estruturais e funcionais da barreira epitelial intestinal na DECHa com foco em proteínas das junções **tight**. Paralelamente, utilizamos o mesmo modelo para estudar o efeito do heme, uma molécula que atua como ativador da resposta imune inata ou DAMP (*"Danger associated molecular pattern"*) em outros contextos inflamatórios, sobre a barreira epitelial intestinal. **RESULTADOS:** Inicialmente, a análise retrospectiva das biopsias de 25 pacientes com DECHa GI permitiu caracterizar a associação da gravidade clínica dessa condição com a perda acentuada de criptas intestinais, mas não foi suficiente para avaliação dos estados das JT. A avaliação mais detalhada destas estruturas no contexto da DECHa GI foi realizada através da imunofluorescência com marcação para a proteína da JT ZO-1, e por microscopia eletrônica, que evidenciaram alterações compatíveis com perda da integridade destas junções por ambas metodologias. Em seguida, demonstramos que o soro de pacientes com DECHa GI colhido após o condicionamento retardou a recuperação da integridade da barreira epitelial tendo como referência o efeito do soro

colhido antes do condicionamento sobre esta mesma barreira. Além disso, o soro causou mudanças na localização da proteína ZO-1, que representa um elemento fundamental das JT. No que diz respeito aos efeitos do heme sobre a integridade da barreira epitelial intestinal, pudemos demonstrar que o heme foi capaz de induzir uma redução duradoura da integridade da barreira epitelial, e que heme e LPS possuem efeito sinérgico de quebra da barreira epitelial nestas células. **CONCLUSÃO:** Neste estudo, descrevemos as alterações histológicas mais frequentemente observadas em pacientes com DECHa GI, e apresentamos evidências morfológicas e funcionais da quebra da barreira epitelial intestinal como um dos mecanismos envolvidos com a fisiopatologia da DECHa. Paralelamente, também demonstramos o efeito do heme sobre a barreira epitelial intestinal, bem como sua sinergia com o LPS.

Palavras chave: transplante de células tronco hematopoéticas; doença do enxerto contra hospedeiro aguda; junções tight.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute host graft disease (GVHD) is the major cause of early morbidity and mortality in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The breakdown of the intestinal epithelial barrier in the early phase of HSCT is recognized as a critical pathophysiological event for GVHD. This break allows the translocation the lumen of the intestinal to submucosal and stimulates the activation of donor T lymphocytes, which act as effectors of the immune response responsible for the GVHD. The intestinal epithelium maintains its barrier function through junctional complexes, among which the **tight junctions (TJ)**. These dynamic multiprotein complexes regulate the passage of solutes, through the activation of pathways and signaling by stimuli from the external environment. In recent years, the protein interactions and the stimuli responsible for the functional regulation of TJ have been described in detail, allowing the exploration of these mechanisms in diseases in which the breakdown of the epithelial barrier plays a relevant role. Despite these advances, fundamental aspects of the pathophysiology of GVHD, such as the cellular and molecular mechanisms that allow the translocation of intestinal lumen antigens, and the final effector mechanisms that result in profuse diarrhea, have not yet been elucidated. In this context, this work aimed to explore structural and functional alterations of the intestinal epithelial barrier in the GVHD with a focus on **tight junction** proteins. In parallel, we used the same model to study the effect of heme, a molecule that acts as an activator of the innate immune response or DAMP (Danger associated molecular pattern) in other inflammatory contexts, on the intestinal epithelial barrier.

RESULTS: Initially, the retrospective analysis of the biopsies of 25 patients with intestinal GVHD allowed characterizing the association of the clinical severity of this condition with the marked loss of intestinal crypts, but it was not enough to evaluate the TJ states. The more detailed evaluation of these structures in the context of the intestinal GVHD was performed by immunofluorescence with labeling for TJ ZO-1 protein, and by electron microscopy, which evidenced alterations compatible with loss of the integrity of these joints by both methodologies. Next, we demonstrate that serum from patients with intestinal GVHD harvested after conditioning delayed the recovery of epithelial barrier integrity based on the effect of serum harvested prior to conditioning on this same barrier. In addition, the serum caused changes in the localization of the

ZO-1 protein, which represents a fundamental element of the TJ. Regarding the effects of heme on the integrity of the intestinal epithelial barrier, we could demonstrate that heme was able to induce a lasting reduction in the integrity of the epithelial barrier, and that heme and LPS have a synergistic effect of breaking the epithelial barrier in these cells. **CONCLUSION:** In this study, we describe the histological changes most frequently observed in patients with intestinal GVHD, and present morphological and functional evidence of intestinal epithelial barrier breakage as one of the mechanisms involved with the pathophysiology of GVHD. In parallel, we also demonstrated the effect of heme on the intestinal epithelial barrier, as well as its synergy with LPS.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation; graft versus host disease; tight junctions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrando a fisiopatologia da DECHa.....	23
Figura 2. Representação das junções tight.....	25
Figura 3. Medida da resistência paracelular realizada no método do voltímetro epitelial Millicell® - ERS.....	42
Figura 4. Esquema do adaptador trans-filtro ECIS®.....	45
Figura 5. Principais alterações histopatológicas observadas em biópsias do TGI gastrointestinais compatíveis com a presença da DECHa GI.....	52
Figura 6. Características clínicas da DECHa GI	54
Figura 7. Imunofluorescência realizada com anticorpo anti-ZO-1 em amostras controles.....	56
Figura 8. Imunofluorescência realizada com anticorpo anti-ZO-1 em pacientes com DECHa GI.....	57
Figura 9. Microscopia eletrônica realizada em amostras de pacientes com DECHa e em controles.....	59
Figura 10. Microscopia eletrônica realizada em amostras de pacientes com DECHa e controles.....	60
Figura 11. Níveis de Zonulina em pacientes com e sem DECHa GI.....	62
Figura 12. Evolução temporal dos níveis de Zonulina em controles sem DECHa e em pacientes com DECHa GI.....	63
Figura 13. Ação do TNF- α e do IFN- γ nas mudanças da resistência transepitelial.....	64
Figura 14. Ação do TNF- α e do IFN- γ nas mudanças da resistência transepitelial.....	65
Figura 15. Monocamadas de Caco-2 incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles coletadas antes e após o condicionamento.....	66
Figura 16. Monocamadas de Caco-2 com pré tratamento com TNF- α e incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles sem DECHa coletadas antes e após o condicionamento.....	68
Figura 17. Variação TEER em monocamadas de Caco-2 pré tratadas com TNF- α e após incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles sem DECHa coletadas.....	69

Figura 18. Efeito sinérgico do TNF- α e IFN- γ nas monocamadas de células epiteliais.....	70
Figura 19. Imagem ilustrativa do efeito do soro humano na morfologia da monocamada epitelial.....	71
Figura 20. Monocamadas de células epiteliais intestinais incubadas com heme nas concentração de 10 μ M ou 50 μ M.....	73
Figura 21. Monocamadas de células epiteliais intestinais incubadas com LPS e/ou heme 10.....	74
Figura 22. . Efeito do heme 50 μ M e heme 10 μ M + LPS 1 μ g/ml na morfologia da monocamada epitelial.....	75
Figura 23. Efeito do heme 50 μ M e do heme 10 μ M+LPS induzindo alterações na arquitetura das junções intercelulares.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros demográficos e clínicos dos casos com suspeita de DECHa GI da coorte retrospectiva.....	48
Tabela 2. Parâmetros demográficos e clínicos da população da coorte prospectiva	49
Tabela 3. Características clínicas dos pacientes com diagnóstico de DECHa GI.....	50
Tabela 4. Distribuição das biópsias por localização.....	51
Tabela 5. Alterações histopatológicas observadas em biópsias gastrointestinais compatíveis com a presença de DECHa GI.....	51
Tabela 6. Características clínicas dos pacientes com DECHa GI.....	53
Tabela 7. Resultados clínicos de acordo com a presença de perda de cripta.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** Célula apresentadora de antígeno
- CMV** Citomegalovírus
- DAMPs** *Damage-Associated molecular patterns*
- DECH** Doença do enxerto-contra-hospedeiro
- DECHa** Doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
- DECHc** Doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica
- GI** Gastrointestinal
- Hb** Hemoglobina
- HLA** *Histocompatibility Leukocyte Antigen*
- HO** Heme oxigenase
- Hp** Haptoglobina
- Hx** Hemopexina
- IL** *Interleukin*, interleucina
- IFN** Interferon
- JT** Junções *tight*
- LH** Linfoma de Hodgkin
- LMA** Leucemia mielóide aguda
- LLA** Leucemia linfóide aguda
- LLC** Leucemia linfóide crônica
- LNH** Linfoma não-Hodgkin
- LPS** Lipopolissacarídeo
- MHC** Major histocompatibility complex
- MRT** Mortalidade relacionada ao transplante
- PAMPs** *Pathogen- associated molecular patterns*
- PCR** Proteína C reativa
- REG-3 α** Regenerating islet-derived protein 3 alpha
- TGI** Trato gastro-intestinal
- TNF** *Tumor Necrosis Factor*, Fator de necrose tumoral
- TBI** *Total body irradiation*, irradiação corporal total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Transplante de células tronco hematopoéticas	19
1.2. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa): aspectos gerais....	20
1.3. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa): fisiopatologia	20
1.4. Aspectos estruturais e funcionais da barreira epitelial intestinal	23
1.5. O papel da zonulina como mediador da função das JT	26
1.6. Significado fisiopatológico da quebra da barreira epitelial intestinal na DECHa	27
1.7. O papel do heme como elemento estimulador da quebra de barreira intestinal	28
1.7.1. Aspectos gerais	28
1.7.2. Papel potencial do heme na fisiopatologia de doenças intestinais	30
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Desenho geral do estudo	33
3.2. Aspectos éticos	34
3.3. Pacientes e controles	34
3.3.1. Coorte prospectiva:.....	34
3.3.2. Coorte retrospectiva:	35
3.4. Definições utilizadas na caracterização da coorte clínica	35
3.5. Dados clínicos e laboratoriais	35
3.6. Amostras biológicas	36
3.7. Células	37
3.8. Avaliação morfológica	37
3.8.1. Histologia.....	37
3.8.2. Imunofluorescência.....	39

3.8.3. Microscopia eletrônica (ME)	40
3.9. Análise funcional da barreira epitelial	40
3.10 Dosagem de Zonulina	42
3.11. Modelo experimental.....	43
3.12. Avaliação funcional utilizando a metodologia ECIS®	43
3.13. Avaliação morfológica	46
3.13.1. Imunofluorescência (IF)	46
3.13.2. Time Lapse.....	46
3.14. Análise estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Caracterização clínica das populações estudadas	48
4.2. Alterações morfológicas observadas na DECHa GI na histologia clássica ..	50
4.3. Correlação entre as alterações observadas no HE com a expressão clínica da DECHa GI.....	53
4.4. Avaliação das alterações morfológicas nas JT em pacientes com DECHa.	55
4.5. Níveis séricos de Zonulina	61
4.6. Avaliação da permeabilidade epitelial induzida pelo soro de pacientes com DECHa	64
4.7. Avaliação das alterações estruturais nas JT em células Caco-2 estimuladas com soro de DECHa	70
4.8. Avaliação da permeabilidade de monocamadas de células Caco-2 estimuladas por heme.....	72
4.9. Avaliação das alterações morfológicas nas JT induzidas pelo heme	75
5. DISCUSSÃO	77
5.1. Alterações morfológicas e a gravidade clínica na DECHa GI	77
5.2. O significado da quebra da integridade da barreira epitelial na DECHa GI .	80
5.3. Participação das JT na fisiopatologia da DECHa GI.....	82
5.4. O papel da Zonulina sobre as alterações da JT na DECHa GI.....	85

5.5. O heme como indutor de quebra da barreira epitelial intestinal	86
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8. APÊNDICES.....	101
9. ANEXOS.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transplante de células tronco hematopoiéticas

O número de transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) tem aumentado progressivamente nos últimos anos, com benefícios para pacientes com neoplasias hematológicas, aplasias, e ocasionalmente alguns tumores sólidos doenças autoimunes. Historicamente, o TCTH exigia a mieloablação completa com transplante de células derivadas de um irmão HLA idêntico. No entanto, avanços recentes expandiram os regimes de condicionamento disponíveis, as fontes de células e por conseguinte, de doadores, aumentando a disponibilidade desta ferramenta terapêutica e melhorando seus desfechos (1).

Em particular, estes avanços consistiram na introdução de novas fontes de CPH (células progenitoras hematopoiéticas) originárias do sangue periférico e de cordão umbilical, melhoria da técnica de tipagem HLA, aumento do número e diversidade étnica do *pool* de doares não relacionados, aperfeiçoamento das terapias de suporte e, por fim, adoção dos regimes de condicionamento de intensidade reduzida e não mieloablativo (2). Todos estes fatores afetaram os padrões de referência e indicações para o TCTH, tornando-o opção curativa para muitos pacientes hematológicos, inclusive para os anteriormente inelegíveis ao procedimento devido à idade ou comorbidade (3).

Um estudo do Centro Internacional de Pesquisa em Transplante (CIBMTR) demonstrou que a sobrevida global (SG) pós-TCTH aumentou significativamente, apesar do aumento do número de doadores não aparentados, do enxerto de células periféricas e da idade avançada dos receptores (4). É importante ressaltar, todavia, que o TCTH, como qualquer modalidade complexa de tratamento, vem acompanhado de uma mortalidade inerente ao procedimento, cuja incidência não é desprezível, e que as modificações na técnica do TCTH também levaram a mudanças, em alguns casos negativas, nos riscos de toxicidade, infecções, falência de órgãos e, no que representa o foco deste projeto, da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

1.2. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa): aspectos gerais

A DECH aguda (DECHa) é uma das principais causas de mortalidade após o TCTH (5), fato que não foi modificado pelo aumento do número de procedimentos nem pelas já citadas modificações tecnológicas que ampliaram o uso do TCTH (6,7). Tendo em vista as tendências atuais, é esperado que o número de transplantes de doadores não relacionados possa crescer nos próximos anos, aumentando substancialmente a população de pacientes com DECH.

Clinicamente a DECH está subdividida em DECHa e DECH crônica (DECHc). No passado a distinção original da DECHa e DECHc dependia da sua ocorrência antes ou após 100 dias da infusão das CPH. Atualmente são as manifestações clínicas (ou mais precisamente, os órgão acometidos) que definem sua classificação. Esta mudança foi implementada a partir de evidências que a fisiopatologia destas duas condições é extremamente distinta. A incidência da DECHa varia de 20 a 80% dependendo dos fatores de riscos presentes (8). O grau de incompatibilidade HLA, o uso de um doador não aparentado, e uso de irradiação corporal total no condicionamento são fatores preditores de maior risco para DECHa. O diagnóstico é predominantemente baseado em achados clínicos, e muitas vezes de exclusão, com acometimento preferencialmente na pele, fígado e intestino. A pele é o órgão mais comumente acometido (81%) no início do quadro seguido pelo trato gastrointestinal (54%) e fígado (50%) (9–11).

Os fatores predominantes que levam à DECH ainda não foram totalmente elucidados. Os linfócitos do doadores foram inicialmente implicados na DECH na década de 1950 (12). Uma incapacidade do sistema imunológico do hospedeiro de reconhecer e/ou eliminar as células do doador em componentes sanguíneos alogênicos foi posteriormente identificada como um mecanismo-chave (13).

1.3. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa): fisiopatologia

O modelo fisiopatológico atual da DECHa GI baseia-se em dois conceitos fundamentais: (i) a DECHa representa uma resposta inflamatória exagerada porém normal, mediada por linfócitos T do doador, contra aloantígenos no organismo do receptor; e (ii) estes linfócitos T do doador

encontram um microambiente tecidual profundamente danificado (pela doença de base, infecções concomitantes, e a intensidade do regime de condicionamento), que é permissivo para esta resposta exacerbada (11,14). Com base nestas premissas, a fisiopatologia da DECHa pode ser esquematizada em três fases sequenciais. A relação espaço-temporal destas três fases é dinâmica e varia de intensidade e relevância a depender da severidade e duração da DECHa (15).

- **Fase 1:** Ativação das células apresentadoras de antígeno

A irradiação e a quimioterapia usadas durante o condicionamento causam dano tecidual e ativam respostas inflamatórias no hospedeiro. O dano ao trato gastrointestinal (TGI) é considerado particularmente importante, pois permite a translocação de lipopolissacarídeos (LPS), componentes celulares, e uma série de outros antígenos, que podem colaborar com a ativação do sistema imune do hospedeiro via receptores TLR ou outros elementos da resposta imune inata (16). De fato, a quebra da barreira intestinal nesta fase é demonstrada em humanos há algumas décadas (17–19). Esta ativação resulta na expressão de citocinas próinflamatórias, moléculas de adesão e outras moléculas coestimuladoras, que em última instância aumentam a capacidade funcional de células apresentadoras de antígeno (APC) do hospedeiro (14).

- **Fase 2:** Ativação, migração e diferenciação das células T do doador

Nesta fase, linfócitos T do doador infundidos junto com as CPH interagem com APC ativadas do receptor. O papel central de linfócitos T do doador nesta fase, e na DECHa como um todo, é ilustrado pela abolição desta complicação através da depleção de linfócitos T do enxerto com CPH (14). Esta interação leva à ativação e proliferação de linfócitos T alorreativas, que montam uma resposta imune de perfil predominantemente TH1, com expressão de IL-2 e IFN- γ . Estas citocinas desempenham um papel central na expansão clonal de linfócitos T citotóxicos e na ativação de fagócitos mononucleares.

- **Fase 3:** Fase efetora, de lesão tecidual no receptor

Nesta fase, fagócitos mononucleares, sob estímulo de citocinas secretadas pelos linfócitos T, e de sinais secundários gerados pela ativação da

resposta imune inata na fase 1 da DECHa, passam a secretar quantidades ainda maiores de citocinas pró-inflamatórias, levando ao que é conhecido como “tempestade de citocinas” (20). Esse processo resulta na amplificação da injúria tecidual local e produção de elementos efetores da resposta imune (linfócitos T citotóxicos, células NK, óxido nítrico), responsáveis pela lesão tecidual observada na DECHa (Figura 1).

A fisiopatologia da DECH aguda não é completamente compreendida. As respostas das células T do doador e as citocinas inflamatórias são os componentes imunológicos mais estudados que medeiam o dano tecidual. A regulação negativa ou inibição da resposta das células Treg e a regulação positiva da resposta das células T efectoras, que é possivelmente exacerbada pelo tratamento com regimes imunossupressores, contribuem para a falta de tolerância das células do doador alogênico aos tecidos receptores (21). A disfunção em APC nos receptores também influencia a ativação imune na DECH aguda (21). No intestino, evidências emergentes sugerem que a desregulação imune observada na DECHa leva a uma perturbação adicional do epitélio intestinal, especificamente células-tronco intestinais, células de Paneth e células caliciformes (22).

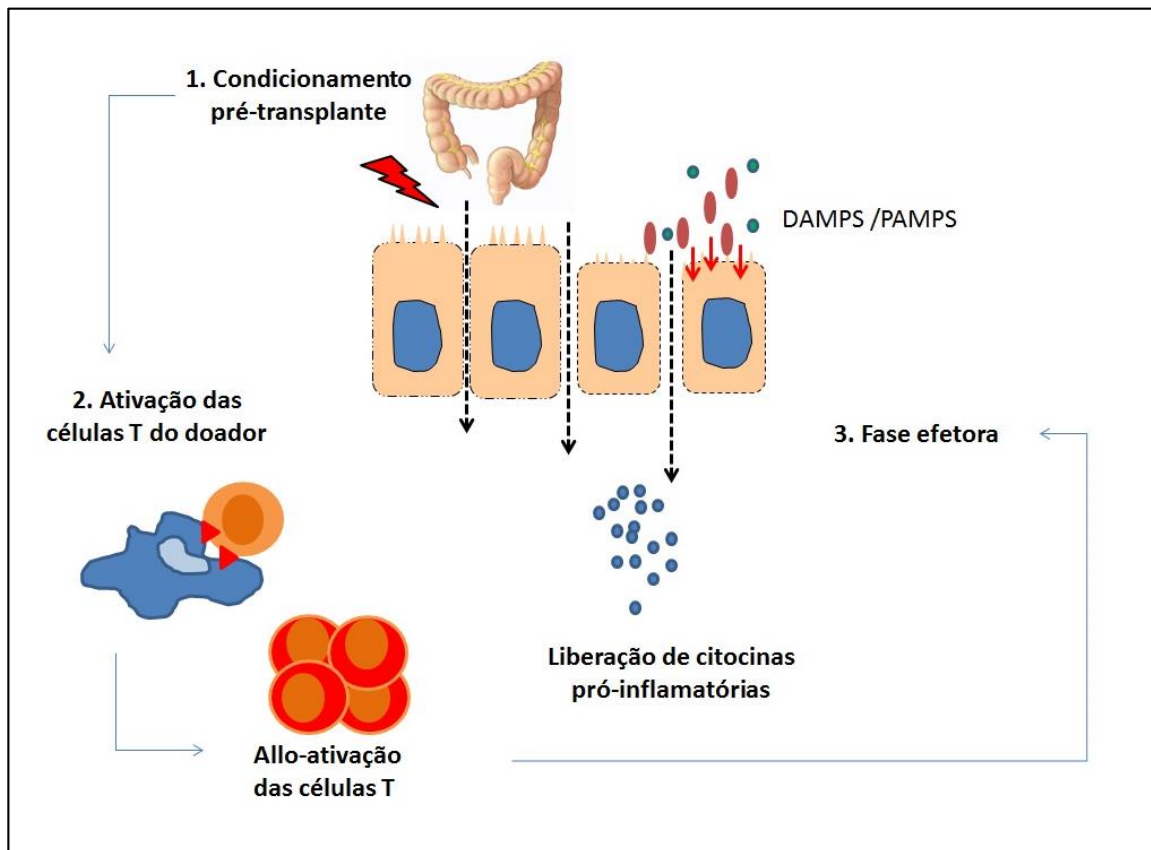


Figura 1. **Esquema ilustrando a fisiopatologia da DECHA**, em destaque: **1. Condicionamento pré-transplante**, causa a perda da integridade inicial a barreira epitelial do trato gastrointestinal (TGI). **2. Ativação das células T do doador**, a partir da interação com as células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor, favorece a apresentação aos aloantígenos e por consequência promove a diferenciação e amplificação das células T do doador. **3. Fase efetora**, nesta etapa ocorre a exacerbação da quebra da barreira epitelial intestinal, com destaque para a participação dos DAMPs, PAMPs e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

1.4. Aspectos estruturais e funcionais da barreira epitelial intestinal

O processo de absorção, secreção e transporte através do epitélio de água, íons e moléculas orgânicas é rigidamente regulado pela barreira epitelial intestinal, que consiste na membrana plasmática apical dos enterócitos e nas junções intercelulares (23). O transporte transcelular através da membrana plasmática apical é regulado por bombas e canais de membrana específicos. Por outro lado, o transporte paracelular é protegido pelas JT, que formam uma faixa

contínua que envolve as células epiteliais adjacentes (23). As JT são complexos multiproteicos localizados na região apical do epitélio intestinal, que regulam a permeabilidade epitelial e a difusão paracelular. Duas vias principais, citadas na literatura inglesa como “leak” (de vazamento ou perda) e “pore”, (de poros) regulam o transporte através das JT e influenciam a resistência elétrica transepitelial (TEER), um parâmetro frequentemente utilizado na avaliação da permeabilidade transepitelial (24). A via de perda controla o transporte paracelular de grandes solutos não carregados (proteínas e LPS bacterianos, mas não células bacterianas). Por outro lado, a via de poros restringe o transporte de moléculas grandes e carregadas ($> 4 \text{ \AA}$). A permeabilidade da via do poro é regulada pela quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), que é diretamente modulada pelo TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e PKC (25–29).

As JT são estruturas dinâmicas com arquitetura complexa. Eles são compostos por proteínas transmembrana e proteínas de suporte (ou adaptadoras) citoplasmática, que estão diretamente ligadas à citoesqueleto intracelular de actina e microtúbulos, e também a proteínas reguladoras (23,30). Já foram descritas pelo menos 30 proteínas que compõem as JT, com destaque para as claudinas, a ocludina e a ZO-1. As proteínas transmembrana das JT (como as claudinas e ocludinas) interagem com proteínas das células adjacentes através de sua porção extra-citoplasmática. Por sua vez, o domínio intracelular destas proteínas se liga a proteínas adaptadoras como a ZO-1, que conectam mecanicamente as JT ao citoesqueleto de actina (Figura 2). As proteínas transmembrana facilitam a adesão celular e formam a barreira paracelular. As proteínas reguladoras são críticas para a formação de JT e modulação da polarização celular (31–33). Eles também modulam a permeabilidade das JT através da fosforilação das proteínas componentes desta junção (34–36) ou sua expressão (37–39). Uma barreira “gotejante”, caracterizada pelo aumento da permeabilidade das substâncias luminiais tóxicas à JT, é uma característica de diversas condições patológicas (40,41).

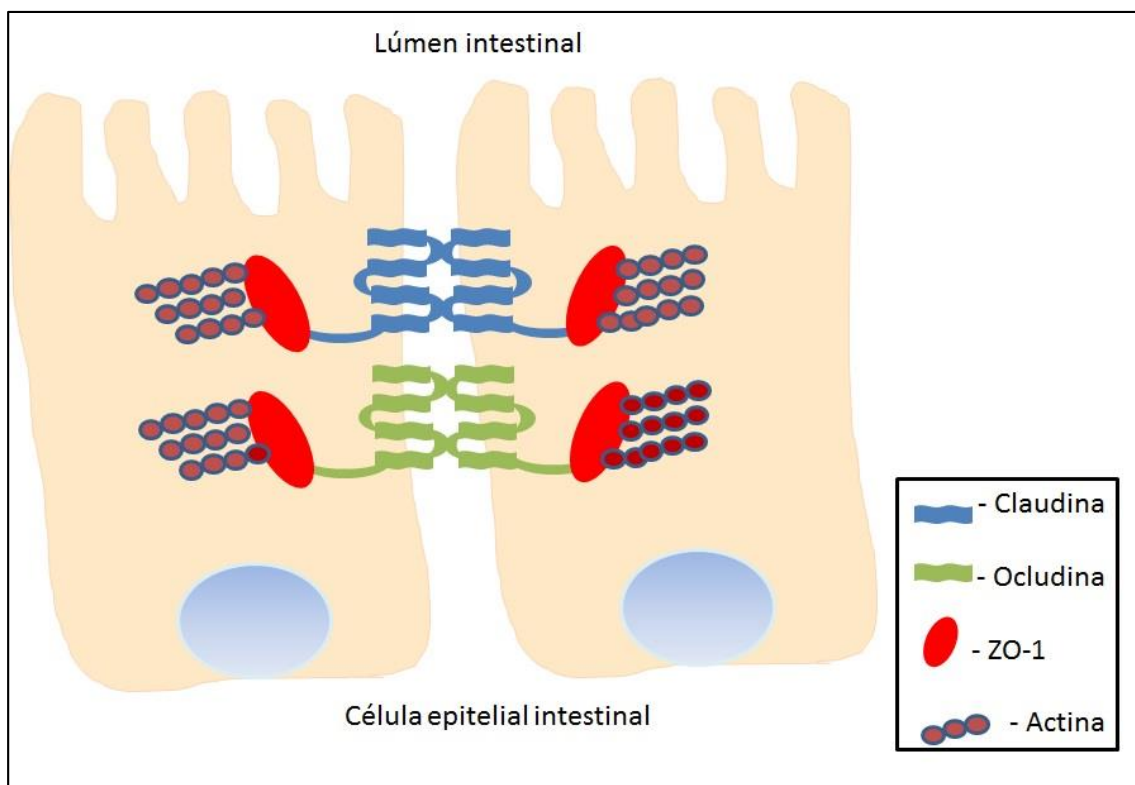


Figura 2. **Representação das junções *tight***. Representação esquemática das principais proteínas das junções *tight* presentes nas células epiteliais intestinais e sua localização.

Essa estrutura complexa permite que as JT atendam à diversidade de desafios fisiológicos ao qual a barreira epitelial é submetida, através de modificações funcionais rápidas e coordenada (42). A capacidade das citocinas, como TNF e $\text{IFN}\gamma$, de regular a função da barreira epitelial foi descrita pela primeira vez há 30 anos (43). Desde então, o aumento da produção proteica das junções, a remoção vesicular, a degradação proteica, a ativação da quinase e a modulação do citoesqueleto têm sido propostas para mediar a perda da função de barreira epitelial induzida por citocinas. Embora a apoptose extensa das células epiteliais também possa causar perda de barreira, a relevância da apoptose unicelular para a disfunção de barreira permanece controversa devido a resultados diferentes em diversos sistemas experimentais (24).

O TNF e o IFN γ modificam a função da barreira epitelial intestinal (43,44), dos rins (45), pulmões (46) e nos epitélios salivares (47), bem como entre as células endoteliais (48). Os efeitos do TNF na integridade da barreira foram melhor estudados no intestino, onde esta citocina tem um papel central em muitas doenças associadas à disfunção da barreira epitelial intestinal, incluindo doença inflamatória intestinal (49), isquemia intestinal (44,50) e na DECH (51).

1.5. O papel da zonulina como mediador da função das JT

Sabe-se que o *V. cholerae* é um dos patógenos entéricos que mais alteram a função da barreira epitelial intestinal, sendo a ruptura das JT um dos mecanismos de quebra de barreira deste patógeno. A toxina Zot (toxina da zônula ocludente), produzida pelo *V. cholerae*, é uma enterotoxina que aumenta reversivelmente a permeabilidade epitelial intestinal. A Zot se liga a um receptor específico na face apical das células epiteliais intestinais e desestabiliza o complexo das JT através de uma via dependente da fosfolipase C e da reorganização do citoesqueleto de actina (52).

A Zonulina é uma proteína de 47kDa, considerada como análoga humana da Zot, e secretada por células intestinais do intestino delgado (53). Mecanicamente, a zonulina se liga ao mesmo receptor da Zot, desencadeando uma cascata de eventos que culmina com o rearranjo do citoesqueleto, redução da expressão da Zo-1 e da ocludina, e ruptura da integridade do complexo das TJ (54). Acredita-se que a Zonulina possa ter como função a regulação funcional das TJ, como parte dos mecanismos fisiológicos de controle da integridade da barreira epitelial intestinal. Desde sua descrição, a zonulina foi implicada na fisiopatologia de várias doenças autoimunes tais como a doença celíaca e diabetes tipo 1 (55). Por estas características, torna-se interessante compreender o papel da Zonulina na regulação da quebra da barreira epitelial intestinal no contexto da DECHa.

1.6. Significado fisiopatológico da quebra da barreira epitelial intestinal na DECHa

Nos últimos anos, a quebra da barreira epitelial intestinal vem sendo considerada um elemento crítico da fisiopatologia da DECHa, especialmente por seu papel na ativação de linfócitos T do doador na fase inicial da doença, hipótese reforçada tanto por dados obtidos em humanos, quanto em modelos animais de DECHa (17–19).

A primeira evidência objetiva da presença de quebra da barreira epitelial em pacientes submetidos a TCTH foi demonstrada em um estudo publicado em 1990 por Fegan e colaboradores em um estudo com 26 pacientes com DECHa (56). Esta observação foi confirmada em 1997 por Johansson J-E e Ekman que avaliaram 19 pacientes submetidos a TCTH através da absorção intestinal de Cr-EDTA marcado radiotivamente em diferentes momentos do TCTH. O principal resultado deste estudo foi a caracterização de uma fase precoce e assintomática de aumento da permeabilidade da barreira intestinal, presente a partir do 2º dia de condicionamento, e persistente até pelo menos o 10º dia pós o TCTH. Em 2001 o mesmo grupo mostrou que os condicionamentos de intensidade reduzida parecem ter um menor efeito negativo sobre a integridade da barreira epitelial (18). Por fim, em 2007, os mesmos pesquisadores observaram o aumento da permeabilidade da barreira intestinal, em particular nos dias +4 e +7 após a infusão das células tronco hematopoéticas foram associadas à severidade da DECHa em uma população de 38 pacientes (19).

Através de um estudo em um modelo animal, a participação específica das JT neste processo de quebra de permeabilidade foi avaliado (57). Utilizando um método de absorção diferencial de lactulose e manitol no jejuno, os autores demonstraram a presença de aumento da permeabilidade paracelular neste modelo, associado a mudanças profundas nas JT demonstradas por microscopia eletrônica, imunofluorescência (IF), imuno-histoquímica (IH) e PCR quantitativo. Do ponto de vista estrutural, os autores mostraram uma redução na expressão da ocludina, sem alterações na expressão da proteína ZO-1. No entanto, cabe destacar que modelos animais de DECHa possuem evidentes limitações, e que embora alterações estruturais nas JT tenham sido demonstradas em outras

doenças inflamatórias intestinais (58), muito pouco se sabe sobre a ocorrência deste tipo de alterações na DECHa em humanos. Em particular, não há de nosso conhecimento dados que caracterizem morfológica e funcionalmente as JT na DECHa humana.

1.7. O papel do heme como elemento estimulador da quebra de barreira intestinal

1.7.1. *Aspectos gerais*

O heme é um grupo prostético de diversas proteínas (hemeproteínas), composto de um anel tetrapirrólico (protoporfirina IX) com um átomo de ferro em estado reduzido (Fe^{2+}) em seu interior. Quando ligado a estas hemeproteínas, o heme desempenha um papel essencial para numerosos processos biológicos, sendo uma molécula essencial para diversas formas de vida. Sua estrutura permite ao heme participar de vários processos celulares em que a rápida transição entre os estados oxidativos do ferro é interessante do ponto de vista funcional. Dentre estes processos, o transporte de oxigênio para os tecidos é certamente o mais conhecido (59). Embora a principal fonte de heme em mamíferos seja a hemoglobina (Hb), é importante lembrar que o heme encontra-se presente em diversas outras proteínas, em praticamente todos os reinos da vida, incluindo bactérias presentes na flora intestinal.

Apesar de sua importância dentro da célula, o heme livre pode ser bastante tóxico para células e tecidos. Esta toxicidade é mediada tanto pela ação direta do heme sobre membranas celulares quanto por mecanismos indiretos, mediados pelo sistema imune inato. As ações diretas decorrem do caráter anfipático do heme, que se intercala nas membranas celulares promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a lesão celular, e são reconhecidos há algumas décadas (60). Já os mecanismos indiretos, baseados na demonstração que o heme livre é um ativador da resposta imune inata passaram a ser estudados mais recentemente, e levaram ao conceito atual de que o heme livre atua como uma alarmina ou DAMP (61). Neste modelo, a liberação de heme em diversas condições patológicas como as anemias hemolíticas congênitas, microangiopatias trombóticas, hemorragia subaracnóidea, doenças infecciosas e sepse (62) contribuiria para a

fisiopatogenia destas condições (63,64). Dados de nosso laboratório recentemente submetidos para publicação confirmam a presença de níveis elevados de heme no choque séptico, bem como sua associação com marcadores de quebra de barreira endotelial nestes pacientes (Fiusa MML, **Costa LNG** et al, submetido para publicação).

As concentrações celulares de heme são rigorosamente controladas, tanto para a eliminação de seus efeitos tóxicos quanto para reaproveitamento do átomo de ferro durante a reciclagem da Hb. Esta regulação é feita pela enzima heme-oxigenase (HO), que conduz o catabolismo do heme em condições homeostáticas e em condições patológicas (65–68). Um aspecto muito importante desta via é que os produtos de degradação do heme (que são a bilirrubina e o monóxido de carbono - CO) possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiapoptóticas. Além disso, o heme também ativa a expressão de outros genes ligados ao fator de crescimento Nrf2 (fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2), cujo efeito final é antioxidativo e anti-inflamatório. Desta forma, a presença do heme livre tem um efeito complexo e heterogêneo sobre células e tecidos, na medida em que esta molécula possui ao mesmo tempo ações citotóxicas, mas também ativa importantes sistemas anti-inflamatórios (59).

Em condições fisiológicas, o sistema intracelular de regulação do heme é suficiente para evitar sua toxicidade direta e indireta. No entanto, é possível imaginar que em situações patológicas caracterizadas por aceleração da liberação de heme este sistema possa se tornar insuficiente. Por exemplo, condições associadas a hemólise, particularmente quando intravascular, levam a liberação de Hb livre para a circulação que, uma vez oxidada a metahemoglobina, resulta na liberação de heme livre para a circulação (59). Outras condições patológicas que também podem cursar com aumento do heme extracelular livre incluem grandes hematomas (pela liberação de Hb das hemácias) e traumas musculares graves (pela liberação de mioglobina) (69–71). Para lidar com este desafio nosso organismo dispõe de dois mecanismos adicionais de proteção, que consistem na haptoglobina (Hp), proteína que se liga à Hb livre prevenindo sua oxidação, e hemopexina (Hx), proteína que se liga ao heme livre no plasma, direcionando para dentro de células (macrófagos e/ou hepatócitos) onde ele será degradado pela HO (72).

1.7.2. Papel potencial do heme na fisiopatologia de doenças intestinais

O epitélio intestinal funciona como uma barreira física contra agentes microbianos patogênicos, bem como coordena respostas imunológicas adequadas contra estes (73). O LPS é um importante componente da parede celular bacteriana Gram-negativa e desempenham um papel importante na mediação das respostas inflamatórias intestinais na doença inflamatória intestinal. A presença do LPS na barreira epitelial intestinal favorece ao aumento da permeabilidade das JT mediado pela regulação da via de sinalização Toll-like 4 (TLR-4) (74). Além disso, heme e LPS atuam por vias semelhantes em macrófago (75).

Várias características das células do epitélio intestinal as caracterizam como agentes ativos nas respostas imune e inflamatória, essas células são capazes de expressar receptores Toll-like, componentes do complexo principal de histocompatibilidade, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (76,77).

No intestino, o heme desempenha importantes papéis na produção de energia, nas enzimas envolvidas na desintoxicação, na geração dos gases mensageiros óxido nítrico (NO) e CO e na bilirrubina antioxidante (78). Os produtos da degradação do heme, nomeadamente o CO e a bilirrubina, restringem o stress oxidativo, a inflamação e regulam o ciclo celular e a diferenciação na região da cripta intestinal (79,80). Em condições inflamatórias do intestino, o epitélio intestinal é privado da proteção do muco secretado, ocasionando lise dos eritrócitos e como consequência à liberação de quantidades elevadas de heme no lúmen intestinal, que interage com as células epiteliais intestinais (81)

O heme dietético é uma fonte importante de ferro para o corpo e a absorção de ferro do heme (ferro-heme) difere do ferro não-heme. Embora o ferro-heme seja mais biodisponível que o ferro não-heme, ele tem capacidade limitada de ser absorvido (78). Portanto, heme não absorvido atinge o cólon. O heme luminal também é derivado do sangue via extravasamento e descamação. Já foi demonstrado que o heme irrita o epitélio do cólon, como evidenciado pela diarreia leve e que a administração de heme, mas não de ferro não-heme em ratos alimentados com dietas purificadas suplementadas com heme oxidado,

mostrou que a água fecal desses ratos tinha propriedades citolíticas, resultante em aumento significativo da proliferação da mucosa do cólon (82).

Além deste efeito irritativo, outro estudo em ratos mostrou que o aumento do conteúdo do heme na dieta levou a aumento da incidência de focos atípicos aberrantes (83), o que pode sugerir um papel carcinogênico para esta molécula no intestino (83,84). Já foi demonstrado em linhagem celular de tumor do cólon humano HT29 que o heme era genotóxico, ocasionando redução do número de células viáveis, danos na membrana e a redução da atividade metabólica medida como parâmetros de citotoxicidade (85).

O efeito do heme sobre a barreira epitelial intestinal já foi estudado por um grupo brasileiro, que utilizou linhagem de células epiteliais do intestino delgado (IEC 6), mostrou um aumento na permeabilidade da monocamada celular que foi acompanhada pela perda das proteínas paracelulares ZO-1 e E-caderina, indicando uma ruptura da monocamada e um possível papel do heme na fisiopatologia da disfunção da mucosa intestinal (81).

Em conjunto, estes dados tornam interessante uma melhor compreensão do efeito do heme sobre a barreira epitelial intestinal.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Avaliar a presença de alterações estruturais e funcionais da barreira epitelial intestinal na DECH aguda com foco em proteínas das junções *tight*.
- Explorar os efeitos do heme sobre a barreira epitelial intestinal

Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações estruturais em biópsias intestinais de uma coorte de pacientes com DECHa utilizada no estudo, bem como as correlações destas alterações com a clínica.
- Avaliar as alterações estruturais nas JT em um subgrupo de pacientes com DECHa
- Avaliar a associação entre os níveis de Zonulina e as manifestações clínicas da DECHa
- Avaliar a permeabilidade intestinal em monocamadas de células epiteliais intestinais estimuladas com amostras de soro de pacientes com DECHa em diferentes fases da doença.
- Analisar as alterações estruturais nas JT, através da distribuição da proteína ZO-1, em monocamadas de células epiteliais estimuladas com soro de pacientes com DECH em diferentes fases da doença.
- Avaliar o efeito do heme sobre a permeabilidade intestinal em monocamadas de células epiteliais intestinais.
- Avaliar o efeito do heme sobre a estrutura das JT em monocamadas de células epiteliais intestinais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho geral do estudo

O estudo foi dividido em etapas com base nos objetivos, identificadas como “etapa clínica”, que compreende todos os experimentos com amostras humanas (incluindo aqueles com cultura de células estimuladas por soro humano), e “etapa *in vitro*”, que compreende os objetivos relacionados ao heme. Na etapa clínica, foram utilizadas amostras obtidas prospectivamente e retrospectivamente, como detalharemos. Nestas amostras avaliamos a presença de alterações estruturais e funcionais na barreira epitelial intestinal, utilizando biopsias intestinais de pacientes com DECHa, amostras de soro de pacientes submetidos a TCTH com ou sem DECHa e cultura de células intestinais estimuladas com soro destes pacientes. As análises morfológicas utilizaram as técnicas de hematoxilina e eosina (HE) (arquivo de amostras do Departamento de Anatomia Patológica), microscopia eletrônica (ME) e imunofluorescência (IF), e foram feitas em parte em amostras de pacientes recrutados retrospectivamente (HE), e parte em amostras obtidas prospectivamente (ME e IF). Foram utilizados métodos que apresentassem maior sensibilidade para caracterizar alterações morfológicas nas JT: IF utilizando anticorpo de uma proteína que compõe as JT (ZO-1), ME e análise por microscopia de *time lapse* para a avaliação das alterações estruturais celulares em tempo real.

Os ensaios funcionais e outros experimentos em culturas de células foram feitos com amostras obtidas da coorte prospectiva. Para as culturas utilizamos duas linhagens comumente utilizadas em estudos de permeabilidade epitelial intestinal: Caco-2 e C2BBE1, sendo esta última um subclone de Caco-2. Dois métodos funcionais foram utilizados de forma complementar: (i) medida da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) com auxílio do voltímetro epitelial (Millicell® ERS-2); e medida em tempo real da TEER com o adaptador trans-filtro ECIS®. A seguir, estes métodos serão apresentados mais detalhadamente. Para isso, dividimos os experimentos em dois blocos.

3.2. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médica, da Universidade Estadual de Campinas (CEP/FCM/Unicamp) como consta o parecer de número 130.243 de 23/10/2012 e conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque. O recrutamento foi dividido em duas estratégias: retrospectiva e prospectiva. Dados e amostras histológicas de pacientes já submetidos ao TCTH no momento do início do estudo, e que apresentaram DECHa GI foram utilizados mediante dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (coorte retrospectiva). Para os pacientes e controles recrutados prospectivamente, o TCLE foi obtido de todos os indivíduos ou seus representantes legais antes de qualquer procedimento.

3.3. Pacientes e controles

3.3.1. *Coorte prospectiva:*

Pacientes submetidos a TCTH na Unidade de TMO da Unicamp entre Novembro de 2012 e Fevereiro de 2014 foram convidados a participar do estudo, e incluídos mediante assinatura do TCLE no momento da admissão na enfermaria para o TCTH. No período foram incluídos 26 pacientes com esta estratégia ativa de recrutamento. Os demais foram excluídos devido a desvios nos procedimentos de coleta e/ou recrutamento tais como perda do momento de recrutamento e/ou coleta/processamento inadequado das amostras. Com o objetivo de mitigar o impacto das perdas de recrutamento, foi estabelecida uma colaboração com a Dra. Maria Elvira Pizigatti Correa, que conduzia um estudo cujo desenho também incluía a obtenção de amostras de plasma e soro nos mesmos tempos em que aqueles utilizados em nosso estudo, e que também avaliava a fisiopatologia da DECH. Com esta parceria pudemos ampliar nossa casuística para 43 pacientes, incluindo alguns pacientes submetidos a TCTH antes do início de nosso estudo (Julho de 2011 a Fevereiro de 2014). O número de amostras de soro, plasma, e tecidos deste grupo é heterogêneo, como destacado nos resultados. Os pacientes que não desenvolveram DECHa foram usados como controles experimentais dos experimentos com amostras

derivadas de coletas de sangue. Para as análises morfológicas, foram utilizados como controles experimentais pacientes sem histórico de TCTH mas que realizaram colonoscopia com biópsia por outras indicações. As indicações utilizadas como controle foram diarreia crônica não relacionada a doença inflamatória intestinal (n=2), e rastreamento de pólipos intestinais (n=1).

3.3.2. *Coorte retrospectiva:*

Foram incluídos neste estudo pacientes que receberam TCTH na unidade de TCTH do Hospital de Clínicas-UNICAMP entre Abril de 2007 e Fevereiro de 2014. Todos os pacientes com suspeita clínica documentada de DECHa GI com base nos registros médicos e/ou na solicitação de endoscopia digestiva (alta ou baixa) devido a suspeita de DECHa foram considerados elegíveis para o estudo e recrutados e/ou convidados a participar. A coorte retrospectiva foi identificada a partir do cruzamento dos dados de duas fontes: (i) registros do serviço de TCTH da Unicamp, e (ii) base eletrônica de resultados de exames anatomopatológicos da Unicamp, na qual foi realizada uma busca com as palavras-chave “Doença do enxerto contra hospedeiro” ou “GVHD”.

3.4. Definições utilizadas na caracterização da coorte clínica

Os regimes de condicionamento foram classificados como alta ou baixa dose com base em critérios previamente publicados (56). Profilaxia farmacológica da DECH consistiu em pelo menos 2 agentes, incluindo um inibidor da calcineurina. Nenhum enxerto de doador foi depletado de células T, e todos os procedimentos foram realizados a partir de doadores relacionados com antígenos leucocitários humanos (HLA) pareados. A DECHa foi diagnosticada e classificada de acordo com os critérios clássicos (7–9).

3.5. Dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos a partir dos registros médico e de enfermagem da unidade TCTH e da base de dados eletrônica dos laboratórios de patologia clínica e anatomia patológica do HC Unicamp ou do Hemocentro da Unicamp.

3.6. Amostras biológicas

As mostras de sangue para obtenção de soro para os experimentos de estimulação de células epiteliais, e para a dosagem de Zonulina foram coletadas por punção venosa periférica ou através de cateter venoso central, pela equipe de enfermagem da Unidade. As amostras foram obtidas em diferentes momentos em relação ao TCTH: (i) pré-TCTH, coletada no momento da internação e antes do início de qualquer tipo de condicionamento; (ii) dia zero (D0), coletada no dia da infusão; e (iii) dia 10 (D10), coletada no 10º dia pós infusão das CPH. Nos pacientes que desenvolveram DECHa, também foram coletadas amostras no momento deste diagnóstico. Os controles experimentais para estas amostras consistiram em pacientes submetidos a TCTH alogênico no mesmo período, mas que não desenvolveram DECHa. Destes controles foram obtidas amostras pré-TCTH, D0 e D10. Após a coleta as amostras de sangue foram submetidas à coagulação natural à temperatura ambiente durante 30 minutos e após centrifugadas a 1.000 x g, por 15 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento. O soro obtido foi imediatamente separado em alíquotas e armazenado a – 80°C até o dia da realização dos experimentos.

Em relação às amostras de tecido, além da revisão dos cortes histológicos da coorte retrospectiva (detalhada abaixo), foram obtidas amostras de tecido intestinais dos pacientes inseridos prospectivamente durante os procedimentos endoscópicos indicados por motivos diagnósticos. As amostras foram coletadas pela equipe de endoscopia do Gastrocentro-Unicamp no período pós-TCTH. Foram obtidas biopsias localizadas nas regiões do duodeno, íleo e colón. Após a coleta as amostras direcionadas para a avaliação histológica foram acondicionadas em cassetes histológicos e fixados em formalina tamponada 10% (Sigma®); os fragmentos avaliados pela técnica de imunofluorescência foram incluídos e congelados em meio Tissue-Tek O.C.T. (Sakura®); e para a realização da microscopia eletrônica, as amostras foram conservadas em meio Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2) e refrigeradas a 4°C até o dia da realização da técnica. Nas análises de amostras histológicas, os controles experimentais consistiram em pacientes submetidos a colonoscopia, sem evidência de coagulopatia, mediante assinatura de TCLE específico para este fim.

3.7. Células

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram a Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™) e C2BBE1 [clone de Caco-2] (ATCC® CRL-2102™) compradas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA), que consistem em linhagem de adenocarcinoma epitelial colo-retal. Estas linhagens desenvolvem características morfológicas de enterócitos normais quando cultivadas em meios específicos (86,87). A linhagem C2BBE1 foi selecionada de uma linhagem de Caco-2 para a expressão de proteínas de borda de escova, sendo portanto um subclone de Caco-2. Quando cultivadas pela primeira vez, estas células crescem em pequenas colônias que se espalham ativamente. Quando as células se aproximam da confluência, eles ficam mais compactados, ocupam menos a área da superfície do frasco e assumem uma morfologia colunar. A densidade da semeadura celular foi selecionada para subcultivar células uma vez por semana ou quando as colônias se fundem de tal forma que ~ 80% da área da superfície do frasco é coberta e as células nas bordas das ilhas de células ainda estão planas e confluentes.

As células foram cultivadas em meio Eagle's Minimum Essential Meddium - EMEM (Lonza Biomédica Ltda, Allendale, NJ, EUA) suplementado com soro fetal bovino 20% e 100UI/ml de estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ em frascos de 75 cm² por aproximadamente 2 semanas antes da tripsinização (0,25% tripsina-EDTA). O meio foi substituído a cada 3 dias. Quando confluentes, as células foram tripsinizadas, contadas e utilizadas nos ensaios ou replicadas para manutenção da linhagem. Após a obtenção da monocamada, os experimentos foram iniciados. Alternativamente, protocolos semelhantes foram utilizados para a linhagem C2BBE1, cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagles's Medium- DMEM (Lonza Biomédica Ltda, Allendale, NJ, EUA) suplementado com soro fetal bovino 10%, 100UI/ml de estreptomicina. Todos os experimentos foram realizados com células entre a 3^a e 22^a passagem.

3.8. Avaliação morfológica

3.8.1. *Histologia*

A avaliação das alterações histológicas foi realizada na coorte retrospectiva. Inicialmente os achados histológicos das biópsias foram obtidos a

partir dos relatórios patológicos (laudos) originais, que consideram como achados compatíveis com DECHa GI as seguintes alterações: presença de corpos apoptóticos, abscessos nas criptas, perda de criptas individuais ou contíguas ou desnudamento ou ulceração total da mucosa. Embora essas alterações sejam usadas no sistema de classificação clássica usado para classificar os achados histológicos de DECHa (17,19), a classificação não era regularmente incluída nos laudos originais. Portanto, todos estes casos foram revisados através da análise microscópica com a coloração de HE por dois investigadores, que graduaram as alterações compatíveis com DECHa GI usando uma modificação do sistema de graduação descrito por Lerner et al (57):

- Grau I - corpos apoptóticos isolados sem perda da cripta
- Grau II - perda de cripta isolada
- Grau III - perda de 2 ou mais criptas contíguas;
- Grau IV - extensa perda de criptas com denudação da mucosa (57).

Com base em um estudo que havia associado a gravidade da perda de criptas com evolução menos favorável, todos os casos com DECHa GI graus histológicos III ou IV foram também agrupados em uma categoria arbitrariamente definida como “perda de criptas grave” (42).

Para as análises, novas lâminas foram preparadas para todos os casos incluídos nesta análise a partir dos blocos arquivados em parafina. As biopsias de duodeno, íleo e cólon foram acondicionados em cassetes histológicos e fixados em formalina tamponada 10% (Sigma®). Após 24 horas os cassetes foram transferidos para solução de álcool 70% até inclusão em resina Paraplast (Sigma®). Para confecção das lâminas, cortes seriados dos blocos foram realizados no micrótomo e, após fixação, os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram codificadas, para impossibilitar a identificação dos grupos, e a leitura das amostras foi realizada em microscópio óptico (Nikon® modelo Eclipse E200).

3.8.2. Imunofluorescência

A IF foi utilizada para marcar constituintes da JT (ZO-1) tanto em amostras teciduais de pacientes quanto em células estimuladas com soro de pacientes. Os detalhes dos ensaios de IF em células em cultura serão apresentados na descrição da etapa *in vitro* (item 3.13). Em relação às amostras teciduais de pacientes, os fragmentos de duodeno, íleo e cólon foram congelados e incluídos em meio Tissue-Tek O.C.T. (Sakura®) a -20°C. Os cortes dos tecidos foram feitos no criostato a -20°C com 4 µm de espessura e colocados sobre lâmina contendo adesivo de polilisina, e fixados em acetona por 10 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes durante 5 minutos em solução tampão fosfato (pH 7,4). O material seguiu para o processo de desparafinização e hidratação com xilol e álcool, e após foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 10M pH 6,0 à temperatura ambiente. Na sequência as lâminas foram aquecidas com o tampão em banho-maria à temperatura de 95-99°C por 10 minutos e após resfriadas com o tampão por 30 minutos na bancada. Após as lâminas foram lavadas em água deionizada 3 vezes por 5 minutos cada e com PBS por 5 minutos.

A etapa de imunomarcagem foi realizada em câmara úmida e escura. O bloqueio foi realizado por 1h com soro não imune. Na sequência foi adicionado as lâminas o anticorpo primário anti ZO-1 monoclonal (ThermoFisher #33-9100) e incubadas a *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS 3 vezes por 5 min cada, seguindo para a incubação com o anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (Invitrogen™) por 1-2 horas à temperatura ambiente e no escuro. Após, as lâminas foram lavadas com PBS 3 vezes por 5 min cada e montadas utilizando o meio de montagem para fluorescência (Fluoromont G® ou Mounting Medium UltraCruz™). As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão em óleo.

3.8.3. *Microscopia eletrônica (ME)*

O material selecionado para a realização da ME foi coletado e conservados imediatamente em meio Karnovsky e fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2).

Os cortes foram realizados por ultramicrotomia para a obtenção de cortes ultrafinos de material biológico. Cortes de aproximadamente 300 nm foram corados em solução de azul de toluidina a 2% para a detecção das regiões de interesse, selecionando-se preferencialmente as regiões contendo criptas intestinais e microvilosidades luminais. Após a seleção das regiões de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de aproximadamente 90 nm. Os cortes foram coletados na água e posicionados sobre uma grade de cobre.

Para intensificar o contraste dos cortes ultrafinos, as grades foram colocadas sobre uma gota de acetato de uranila 5% em água destilada durante 5-30 minutos, com o corte voltado para a gota. Esta foi previamente depositada sobre um pedaço de “parafilme” no fundo de uma placa de Petri, devidamente protegida da poeira ambiente. Em seguida, lavou-se a grade em água destilada. O excesso de água foi absorvido com um pedaço de papel filtro, e então colocado a grade sobre uma gota de citrato de chumbo durante 5-30 minutos, lavando-se e secando-se como descrito anteriormente. Após a contrastação, o corte seguiu para ser examinado no microscópio eletrônico.

As análises foram feitas em um microscópio eletrônico modelo EM-10 Zeiss.

3.9. Análise funcional da barreira epitelial

A integridade das células Caco-2/C2BBE1 nas amostras estimuladas com soro de pacientes foi determinada através da mensuração da resistência elétrica transepitelial (TEER) com o voltímetro epitelial Millicell® - ERS (Millipore, USA), um método amplamente aceito na literatura para este fim (88,89).

Para os experimentos as células inicialmente subcultivadas em placas de 75 cm² por 7 dias ou até o momento que as colônias apresentam uma confluência de ~ 80% da área da superfície do frasco e as células nas bordas das ilhas de células ainda estavam planas e confluentes, após a confirmação da confluência,

as células foram tripsinizadas com tripsina/EDTA (0,25%/1 μ M) por 20 minutos a 37°C e submetidas a leve agitação mecânica. A inativação da enzima foi feita com solução (20 mL) de meio suplementado com soro fetal bovino e a suspensão celular foi submetida a uma centrifugação de 1500 rpm por 10 minutos. O pellet de células foi ressuspense em meio e semeado nos insertos porosos (2x10⁵ células/inserto). Os poços que continham os insertos receberam 1 mL do meio na região basal e 200 μ l na região apical.

Para a realização da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER), as células foram cultivadas sobre insertos porosos com poros de 0,4 μ m e área de 0,33 cm², acondicionados em placas de cultura transparentes com 2 compartimentos (Corning®, Transwell®). Esta metodologia permite a avaliação da permeabilidade da barreira epitelial através de mensuração do gradiente elétrico paracelular, permitindo assim monitorar células vivas durante seus vários estágios de crescimento, diferenciação e após estímulos diversos aplicados ao compartimento superior e inferior. Para cada experimento, as células Caco-2 e C2BBE1 (2,5 x 10⁵ células/poço) eram mantidas por 18 a 21 dias e tratadas na região apical e basolateral com troca de meio a cada 48 horas antes da realização do experimento.

A morfologia celular e a formação da monocamada foram registradas por microscopia óptica e confirmadas pela medição da TEER durante os dias de experimento.

Os experimentos foram realizados em poços nos quais a resistência elétrica da monocamada de células epiteliais tinham atingido uma resistência específica de 1000 Ohm (voltímetro epitelial Millicell® - ERS), indicativos de confluência celular e a integridade da barreira epitelial (90,91). As células confluentes foram submetidas ao *serum starvation* (condição reduzida de suplementos e fatores de crescimento para que as células diminuam sua taxa metabólica) em meio específico para cada linhagem celular suplementado com soro fetal bovino a 1% (meio *starving*) antes da estimulação. Em seguida, as células foram estimuladas com soro de pacientes com DECHa ou controles (pacientes submetidos a TCTH, sem suspeita de DECHa), e a TEER foi monitorada por até 96 horas no método do voltímetro epitelial Millicell® - ERS.

Conforme ilustrado na figura 3, as medidas foram realizadas manualmente pelo pesquisador, através da inserção dos sensores nos compartimentos superiores e inferiores. Após a inserção, aguarda-se um período de 60 segundos ou até estabilização da leitura. Para cada momento são realizadas 3 leituras, registradas em planilha excel. Para facilitar as comparações entre experimentos, a TEER das monocamadas foram normalizadas com o controle (branco) realizado concomitantemente.

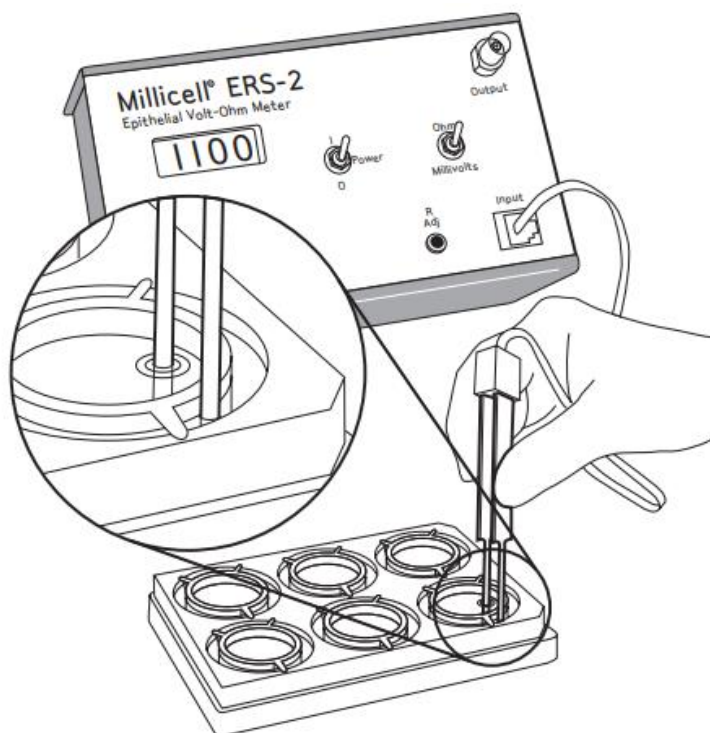


Figura 3. **Medida da resistência paracelular realizada com o método do voltímetro epitelial Millicell® - ERS.** Ilustração da medida realizada em placas de insertos porosos contendo as monocamadas celulares. FONTE: Millicell® ERS-2 Electrical Resistance System User Guide.

3.10 Dosagem de Zonulina

Os níveis de Zonulina foram determinados por em método imunoenzimático (Elisa) comercial (IDK Zonulin Elisa kit, IµMundiagnostik, Bensheim, Alemanha), de acordo com as orientações do fabricante. O valor de referência reportado pelo

fabricante para indivíduos saudáveis é de 20 – 48 ng/ml, com uma variabilidade intraensaio de 3.4 – 6.0% e interensaio de 13.3 – 13.6%.

Parte 2: Etapa *in vitro*

3.11. Modelo experimental

Para os estudos com heme e outros mediadores, utilizamos o mesmo modelo experimental de monocamadas de células Caco-2/C2BBE1. As monocamadas foram estimuladas com LPS, TNF- α e IFN- γ , cujo efeito promotor da quebra da barreira epitelial já foi demonstrado em outros estudos com metodologias semelhantes (86,87,92). O LPS foi obtido da Sigma® e o TNF- α e oIFN- γ foram obtidos da BioLengend®.

O heme utilizado em nosso estudo foi obtido da Frontier Scientific®, dissolvido em NaOH 0,1 M (Ph 7,4) e diluído em água estéril. A solução de trabalho de heme foi preparada no escuro e filtrada imediatamente antes da utilização. Conforme detalhado adiante, as células foram estimuladas com heme em diferentes concentrações. Devido ao fato de o heme ligar-se fortemente a proteínas presentes no soro usado na cultura celular, o que o impede de exercer sua função próinflamatória ou sua toxicidade direta, as células foram reestimuladas com heme a cada 24 horas. Durante o experimento, as células foram monitoradas, com medidas contínuas da permeabilidade da barreira epitelial por até 96 horas.

3.12. Avaliação funcional utilizando a metodologia ECIS®

A integridade da barreira epitelial realizada nos ensaios da etapa *in vitro* foi avaliada através do sistema ECIS® (Electric Cell-substrat Impedance Sensing, Applied BioPhysics, Troy, NY). O ECIS é um método baseado em impedância, utilizado para estudar as atividades celulares *in vitro* em tempo real, estas incluem alterações morfológicas, locomoção celular e outros comportamentos dirigidos pelo citoesqueleto das células. Essa metodologia apresenta o mesmo princípio do voltímetro epitelial Millicell® - ERS utilizado na etapa clínica, mas alguns diferenciais são apreciáveis, como por exemplo, registro em tempo real do gradiente elétrico, robustez e uma maior sensibilidade

nos registros dos gradientes elétricos. Para a avaliação em tempo real da resistência elétrica transepitelial (TEER), representando uma estimativa razoável da permeabilidade paracelular (93).

Para a realização deste método as células foram cultivadas em insertos porosos como já descrito no ítem 3.9. Após 21 dias de crescimento os insertos foram inseridos no adaptador trans-filtro ECIS® para a obtenção dos registros da TEER. Neste modelo, uma pequena corrente alternada é aplicada através do adaptador trans-filtro. À medida que as células crescem e cobrem os insertos, a corrente é impedida de uma maneira proporcional ao número, à morfologia, e à natureza da ligação entre as células que cobrem os eletrodos. Quando as células são estimuladas, as alterações na morfologia celular alteram a corrente elétrica. Isto torna possível avaliar o momento exato e o time-course do aumento da permeabilidade da barreira epitelial (Figura 4).

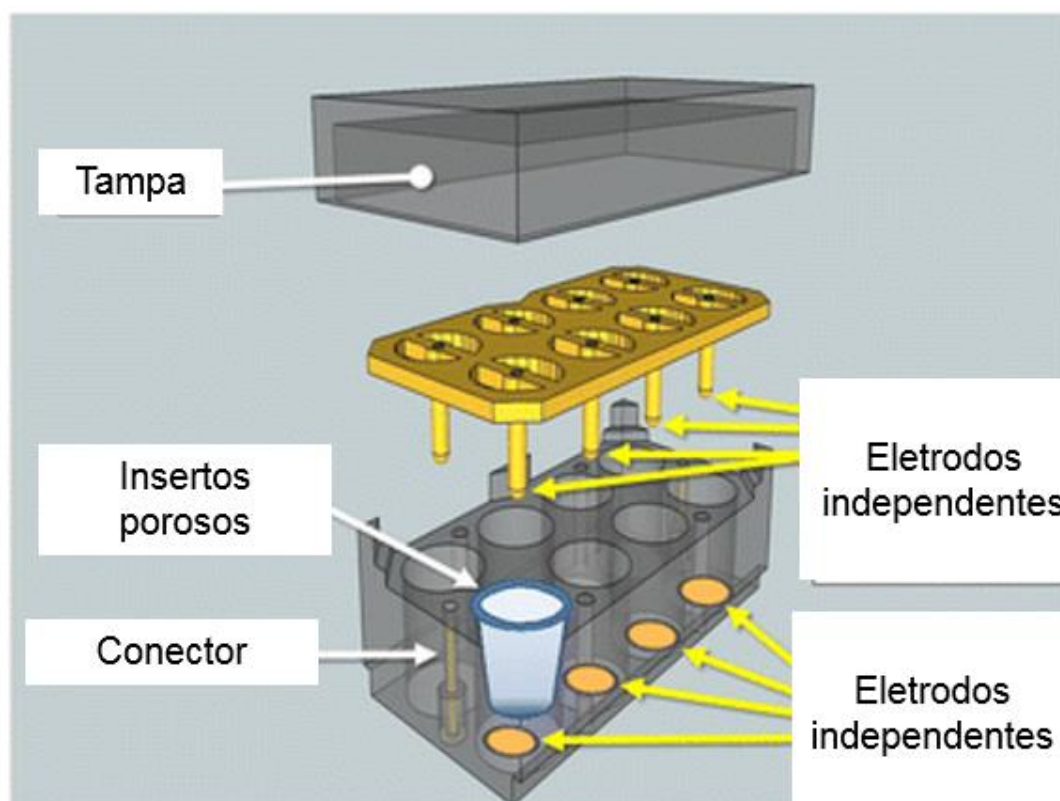


Figura 4. **Esquema do adaptador trans-filtro ECIS®.** Os insertos porosos se encaixam no adaptador trans-filtro 8W, que possui eletrodos de referência individuais embutidos na câmara inferior com eletrodos sensores independentes colocados acima dos filtros. Este dispositivo se encaixa na estação padrão e o converte em um poço múltiplo, um dispositivo baseado em filtro para medições em tempo real da função de barreira. Um software especial converte as medições de impedância do aparelho ECIS feitas com o dispositivo em mudanças no tempo de evolução dos valores da TEER. Fonte: <http://biophysics.com/barrierfunction.php>.

3.13. Avaliação morfológica

3.13.1. *Imunofluorescência (IF)*

As células em cultura foram cultivadas até confluência por 18 a 21 dias em lamínulas de vidro de microscopia, mantidas durante 2 horas em meio *starving* e foram estimuladas com soro (20% v/v), LPS (1 µg/mL), TNF-α (10 µM), IFN-γ (30 µM) e heme (10 µM e 50µM) durante 2 horas. Em seguida, as células foram fixadas em formalina tamponada durante 20 min, lavadas 3 vezes com PBS e tratadas com glicina 10 µM durante 5 min para eliminar os grupos aldeído provenientes da formalina. As células foram então permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100, lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas com albumina de soro bovino à 3% em PBS durante 15 minutos. As lamínulas foram então incubadas durante 30 minutos com anticorpo monoclonal ZO-1 a 37 ° C, lavadas 3 vezes em PBS e incubadas por 30 minutos a 37 ° C com anticorpo secundário isotiocianato de fluoresceína – FITC (Invitrogen™), lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por mais 30 minutos a 37 ° C com faloidina conjugada com Alexa fluor 658 para detectar os filamentos de actina. Após incubação com a faloidina as lamínulas foram lavadas novamente com PBS e montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (Fluoromont G® ou Mounting Medium UltraCruz™). As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão em óleo.

3.13.2. *Time Lapse*

A análise por *Time Lapse* é um processo de obtenção de imagens em sequência, em que a frequência de cada fotograma por segundo de filme é muito menor do que aquela em que o filme é reproduzido. A técnica foi aplicada para acompanhar as mudanças morfológicas das células epiteliais em tempo real após a adição dos estímulos. A análise foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências com auxílio do pesquisador Matheus de Castro Fonseca.

Para a realização da técnica, as células foram cultivadas até a confluência por 18 a 21 dias em lamínulas de vidro de microscopia, mantidas durante 2 horas em meio *starving* e em seguida estimuladas com heme 50µM e heme 10µM com adição do LPS 1 µg/mL. Cada lâmina foi avaliada por 30 minutos após a adição

dos estímulos e as imagens foram registradas a cada 2 minutos. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão em água. As sequencias de imagens foram processadas e organizadas com a utilização do Programa Image J.

3.14. Análise estatística

Para comparação entre grupos com variáveis contínuas foram utilizados o teste de Mann-Whitney ou Student test t, de acordo com a distribuição da variável (não-Gaussiana ou Gaussiana, respectivamente). Para avaliação da associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. As correlações foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Spearman ou Pearson, também conforme a distribuição. Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização clínica das populações estudadas

Durante o período total de cobertura do estudo (considerando suas coortes retrospectiva e prospectiva; de Abril de 2007 a Fevereiro de 2014), um total de 203 pacientes foram submetidos ao TCTH alogênico em nosso centro.

Neste período, biópsias gastrointestinais devido a suspeita clínica de DECHa foram realizadas em 25 pacientes, os quais foram incluídos nesta análise morfológica inicial cujo objetivo foi caracterizar os aspectos clínicos e histopatológicos da DECHa GI em nosso centro. As características clínicas e demográficas desses pacientes são apresentadas na tabela 1. Todos, exceto um destes 25 casos suspeitos apresentavam diagnóstico de DECHa graus clínicos III ou IV de acordo com a classificação clínica de Glucksberg.

Seis pacientes (24%) apresentaram DECHa refratária a esteroides. A mortalidade relacionada ao transplante de um ano (MRT) foi de 40% entre todos os pacientes com DECHa graus III-IV. Todos os seis pacientes refratários a esteróides morreram no primeiro ano após o TCTH.

Tabela 1. Parâmetros demográficos e clínicos dos casos com suspeita de DECHa GI da coorte retrospectiva:

Características	n= 25
Idade , média (min-máx), anos	49 (17-68)
Sexo , n masculino/feminino	19/6
Indicação para TCTH , n	
Leucemia aguda	7
Leucemia mielóide crônica / mielofibrose	2
Linfomas	5
Leucemia linfocítica crônica	3
Mieloma múltiplo	4
Síndrome mielodisplásica	1
Anemia aplástica grave	2
Doença falciforme	1

Doador-feminino/receptor-masculino, n (%)	13 (52%)
Regime de condicionamento, n	
Dose alta	10
Dose baixa	15
Fonte de enxerto, n	
Medula óssea	4
Sangue mobilizado	21
Clínica de diagnóstico DECHa, n	
Graus I-II	1
Graus III-IV	24

TCTH: Transplante de células tronco hematopoéticas; DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro.

Em relação aos pacientes da coorte prospectiva, foram incluídos 43 pacientes submetidos a TCTH alogênico, dos quais 13 apresentaram DECHa GI, e 30 não apresentaram esta complicação. As características demográficas e clínica desta população, da qual foram obtidas amostras para dosagens de Zonulina e testes de estimulação de culturas celulares, são mostradas na tabela 2. Na tabela 3 são mostradas as características dos 13 pacientes com diagnóstico confirmado de DECHa GI.

Tabela 2. Parâmetros demográficos e clínicos da população da coorte prospectiva:

Parâmetros clínicos	Com DECHa (n= 13)	Sem DECHa (n= 30)	P
Idade, mediana (mín-max)	51 (17-68)	43 (21-65)	0.03
Sexo, n, masculino/feminino	4/9	11/19	1
Diagnóstico no TCTH, n			
Leucemias agudas/outros	2/11	14/16	0.08
Sexo doador/receptor, n			
Doador feminino - receptor masculino/outros	6/7	5/25	0.06
Tipo de doador, n			
Relacionado/não relacionado	13/0	24/6	0.15

Fonte de CPH, n			
Medula óssea/sangue periférico	2/11	11/19	0.27
Tipo de condicionamento, n			
TBI/sem TBI	4/19	1/19	0.35
Condicionamento, n			
Mieloablativo/intensidade reduzida e NMA	4/9	22/8	0.01
Status da doença no TCTH, n			
Remissão completa/outros	6/7	24/6	0.03

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes com diagnóstico de DECHa GI (n=13)

Parâmetro clínico	
Data da DECHa GI, dias, mediana (min-máx)	94,5 (33-162)
DECHa GI, grau, n	
0-II	4
III-IV	9
Duração da diarreia, dias, mediana (mín-máx)	16 (2-65)
Pico do volume da diarreia, ml, mediana (mín-máx)	2350 (0-8350)
Desfecho clínico no dia +100, n	
Sobrevivente/óbito	4/9
Resposta à corticoterapia, n	9/4
Responsivo/resistente **	
DECHa não intestinal, n ***	7/13
DECH sobreposição, n	4/13

* Tratamentos utilizados em pacientes córtico-refratários: metilprednisolona + ATG (n=1); metil rednisolona + μ MF (n=1); metiprednisolona+Campath (n=1); metilprednisolona+Simulect (n=1); **: sítios de DECHa: pele (n=6) e/ou fígado (n=5)

4.2. Alterações morfológicas observadas na DECHa GI na histologia clássica

Nos 25 pacientes da coorte retrospectiva, as biópsias intestinais foram compatíveis com a suspeita clínica de DECHa em 22/25 (88%) pacientes. No

total, os espécimes estavam disponíveis no duodeno (n = 15 pacientes), íleo (n = 10 pacientes) e cólon (n = 21 pacientes). A distribuição das biópsias e a presença de achados associados à DECHa GI local são mostradas na Tabela 4. Os achados histológicos associados à DECHa GI em nossa população estudada são mostrados na Tabela 5.

A Figura 5 apresenta as principais alterações histopatológicas observadas em biópsias gastrointestinais compatíveis com a presença de DECHa GI.

Tabela 4. Distribuição das biópsias por localização:

Local da biópsia	Pacientes (n)	Presença de DECHa GI, n (%)
Duodeno	15	15 (100%)
Íleo	10	10 (100%)
Cólon*	21	19 (90%)

* Dos 21 pacientes para os quais a biópsia do cólon estava disponível, 19 tinham amostras das regiões ascendente, transversa e retossigmóide. Os dois pacientes restantes tinham amostras apenas do retossigmóide. DECHa GI: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda gastrointestinal.

Tabela 5. Alterações histopatológicas observadas em biópsias gastrointestinais compatíveis com a presença de DECHa GI (n = 22 pacientes):

Alterações	Duodeno (n=15)	Íleo (n=10)	Cólon (n=19)
Corpos apoptóticos isolados	12/15 (80%)	4/10 (40%)	16/19 (84%)
Perda cripta isolada	0	0	2/19 (11%)
Perda de cripta contígua	4/15 (27%)	2/10 (20%)	4/19 (21%)
Desnudamento da mucosa	3/15 (20%)	2/10 (20%)	6/19 (32%)
Alterações associadas ao CMV	3/15 (20%)	2/10 (20%)	3/19 (16%)
Grau histológico III / IV	7/15 (47%)	4/10 (40%)	10/19 (53%)

DECHa GI: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda gastrointestinal; CMV: citomegalovírus

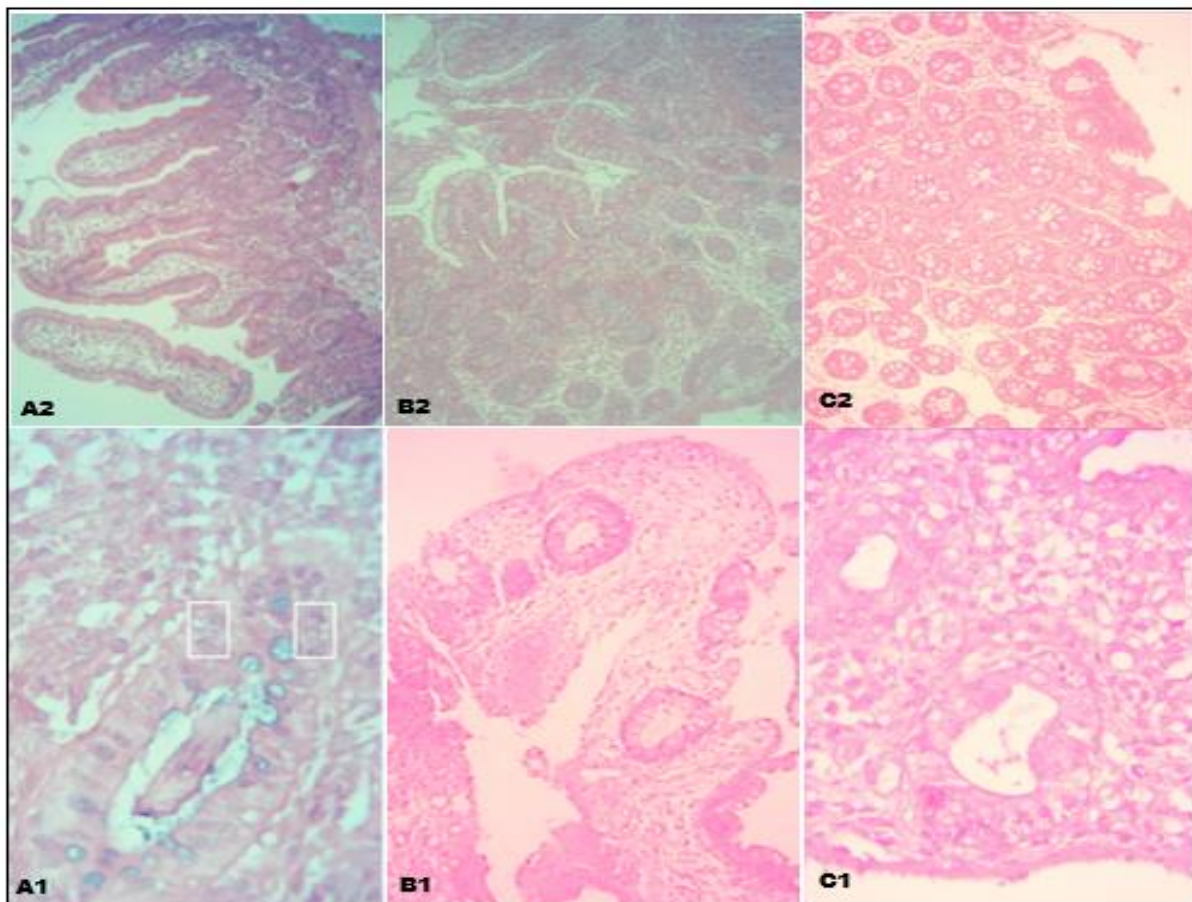


Figura 5. Principais alterações histopatológicas observadas em biópsias gastrointestinais compatíveis com a presença de DECHa GI. A1: Duodeno de paciente com DECHa apresentando intensa perda de criptas, presença de corpos apoptóticos e infiltrado leucocitário. Aumento: 400x. A2: Duodeno de paciente controle. Aumento: 100x. B1: Íleo de paciente com DECHa apresentando perda de criptas, presença de corpos apoptóticos e infiltrado leucocitário. Aumento 100x. B2: Íleo de paciente controle. Aumento: 100x. C1: Cólono apresentando Intensa perda de criptas e presença de corpos apoptóticos. Aumento: 400x. C2: Cólono de paciente controle. Aumento: 100x.

Algumas características clínicas da subpopulação de 22 pacientes com DECHa GI confirmada nas biópsias são mostradas na tabela 6.

Tabela 6. Características clínicas dos pacientes com DECHa GI:

Características clínicas da DECHa GI	n=22
Estágio* da DECHa GI	
0 - 1	3
2 – 3	11
4	6
Dia do diagnóstico DECHa GI, mediana	74 (28-162)
Volume diário máximo de fezes, ml, mediana (range)	2800 (0 - 8650)
Duração da diarreia, dias, mediana (min-máx)	26 (0 – 124)
Regime de tratamento, n (%)	
Esteroides	16 (73%)
Outros **	6 (23%)

* De acordo com Glucksberg H et al., 1974 (94). Dados não disponíveis para 2 pacientes; ** globulina anti-timócito (n = 2), micofenolato mofetil (n = 1), Alentuzumab (n = 2); Basiliximab (n = 1). DECHa GI: doença do enxerto contra o hospedeiro aguda gastrointestinal.

4.3. Correlação entre as alterações observadas no HE com a expressão clínica da DECHa GI

Com o objetivo de explorar se as alterações morfológicas se correlacionam com a apresentação clínica, os pacientes foram divididos conforme a ausência ou presença de perda grave de criptas, correspondente aos graus histológicos I-II e III-IV de DECHa GI respectivamente. Esta classificação foi obtida de um estudo pregresso que propôs que esta característica histopatológica se correlacionaria com a gravidade de DECHa GI (95). Em nossa população a proporção de casos nestes dois grupos foi de 10/22 (45,5%) e 12/22 (54,5%), respectivamente. As diferenças clínicas e demográficas entre esses grupos são mostradas na tabela 7.

Tabela 7. Resultados clínicos de acordo com a presença de perda de cripta:

	Ausência da perda grave de cripta* (n=10)	Grave perda de cripta** (n=12)	P ****
Volume de fezes por dia, pico, ml	1800 (0-4710)	3224 (1792-8650)	0.03
Duração da diarreia, dias	16 (0-124)	24.5 (10-80)	0.02
Dia do diagnóstico de DECHa, dia	94.5 (47-162)	49 (38.5-108.5)	0.18
Resposta ao esteroide, sim/não	1/9	5/7	0.17
MRT (1 ano), sim/não ***	3/6	7/4	0.37

*Correspondente aos graus histológicos I e II da DECHa GI; ** Correspondente aos graus III e IV da DECHa GI; *** Mortes por doença progressiva (n = 2) excluídas da análise; **** Valor de P do teste exato de Mann-Whitney. Dados contínuos apresentados como mediana e intervalo. DECHa GI: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda gastrointestinal; MRT: mortalidade relacionada ao transplante.

Os pacientes com DECHa GI do grau histológico III-IV apresentaram maior volume de fezes e duração da diarreia (Figura 6). Não foram observadas diferenças na frequência de DECHa e MRT refratárias a esteroides (Tabela 7).

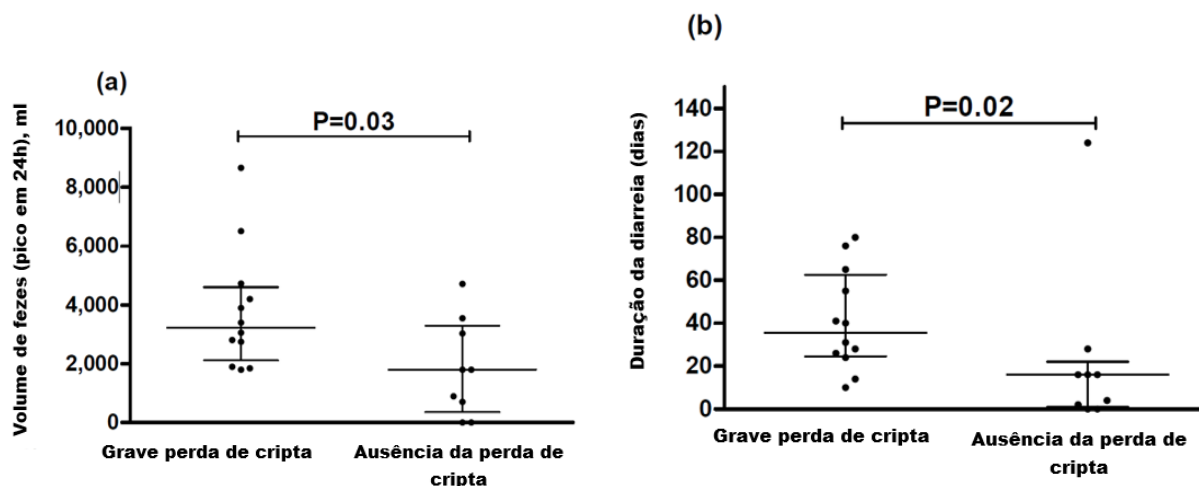


Figura 6. Características clínicas da DECHa GI. Dot plots representando o pico do volume de fezes (ml) em um dia (a) e a duração da diarreia em dias (b) para pacientes com e sem grave perda de cripta. Teste de Mann-Whitney. DECHa GI: Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda gastrointestinal.

4.4. Avaliação das alterações morfológicas nas JT em pacientes com DECHa.

Com o objetivo de explorar especificamente a região das JT, complementamos nossa análise morfológica com estudos de IF e de ME. Estas análises foram feitas em um subgrupo de pacientes da coorte prospectiva para os quais as biópsias diagnósticas para a suspeita de DECHa puderam fornecer amostras congeladas para IF (n=7) ou ME (n=5).

Inicialmente avaliamos a imunolocalização da proteína ZO-1, presente nas JT, como marcador de integridade destas estruturas. Na figura 7 é possível observar uma marcação mais evidente na borda luminal das criptas do material pertencente ao indivíduo controle. Na figura 8 é apresentado a IF realizada em paciente com DECHa GI.

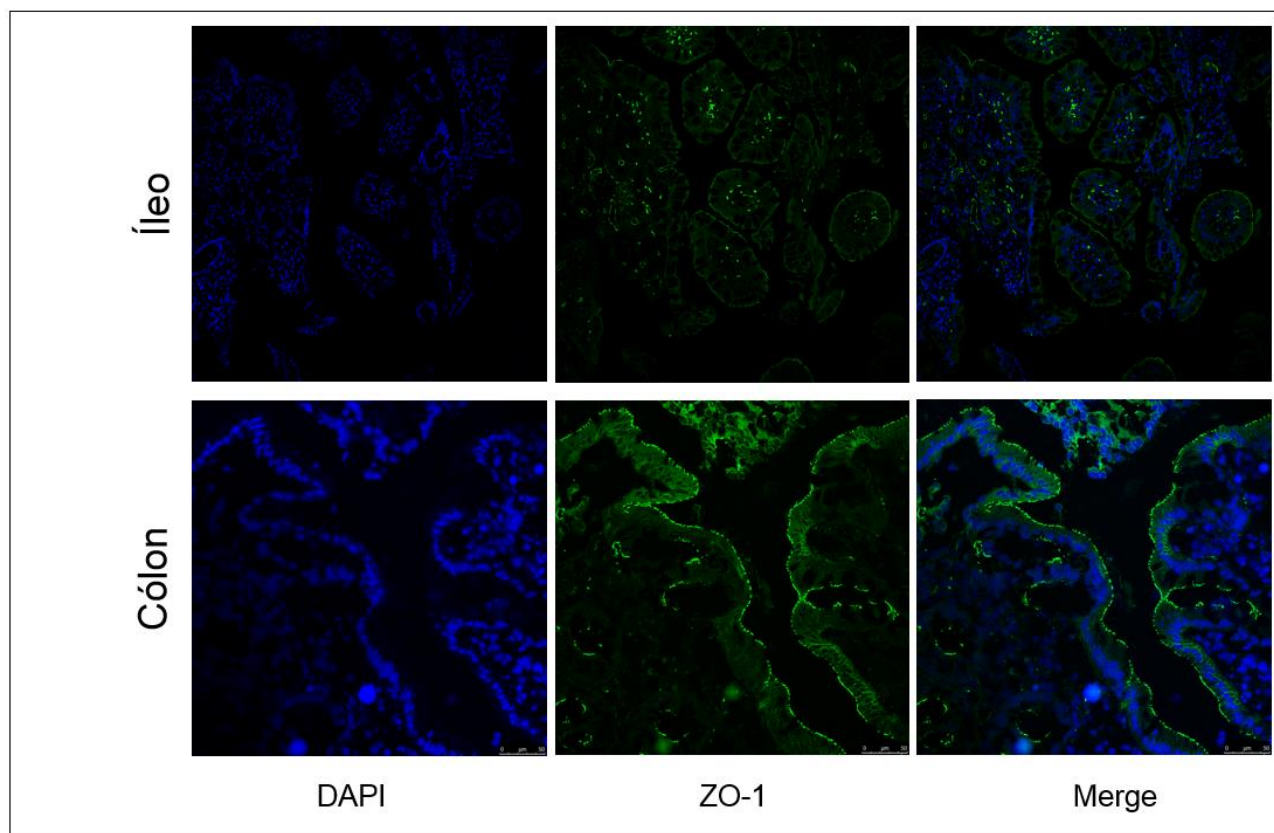


Figura 7. Imunofluorescência realizada com anticorpo anti-ZO-1 em amostras de indivíduos saudáveis. Imagens obtidas por microscópio confocal.

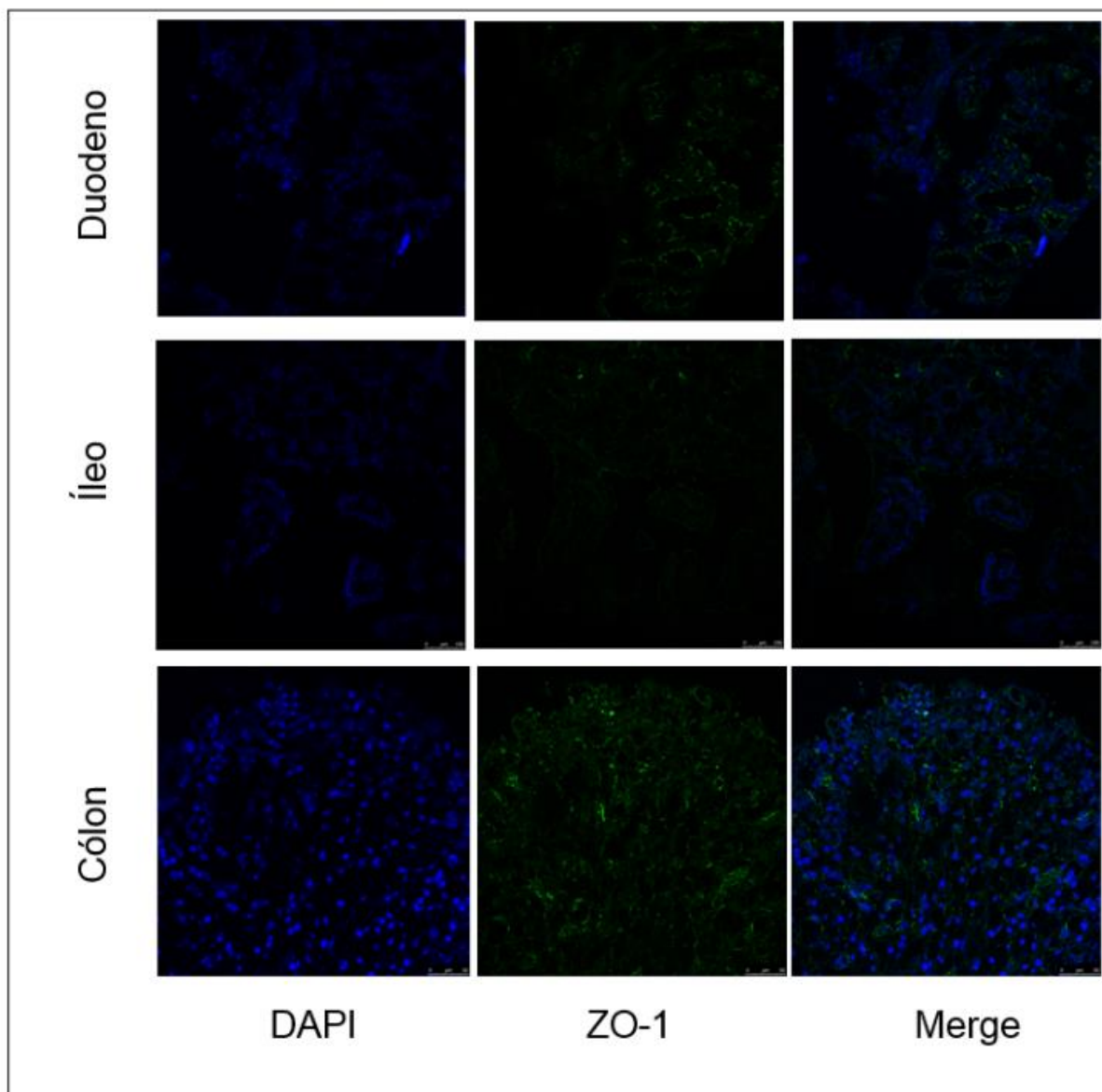


Figura 8. Imunofluorescência realizada com anticorpo anti-ZO-1 em paciente com DECHa GI. Imagens obtidas por microscópio confocal.

A avaliação por ME foi realizada em 5 biópsias intestinais pertencentes a 4 pacientes, nos quais 2 apresentavam DECH GI grau I-II e 2 pacientes com grau III-IV, em amostras de íleo (n=1), duodeno (n=3) e cólon (n=1). As alterações mais evidentes do ponto de vista ultraestrutural foram a perda ou redução das microvilosidades apicais dos enterócitos e a presença de infiltrado inflamatório na submucosa (Figura 9). Na figura 10 é exibido o aumento do espaço intercelular e desarranjos na região das JT.

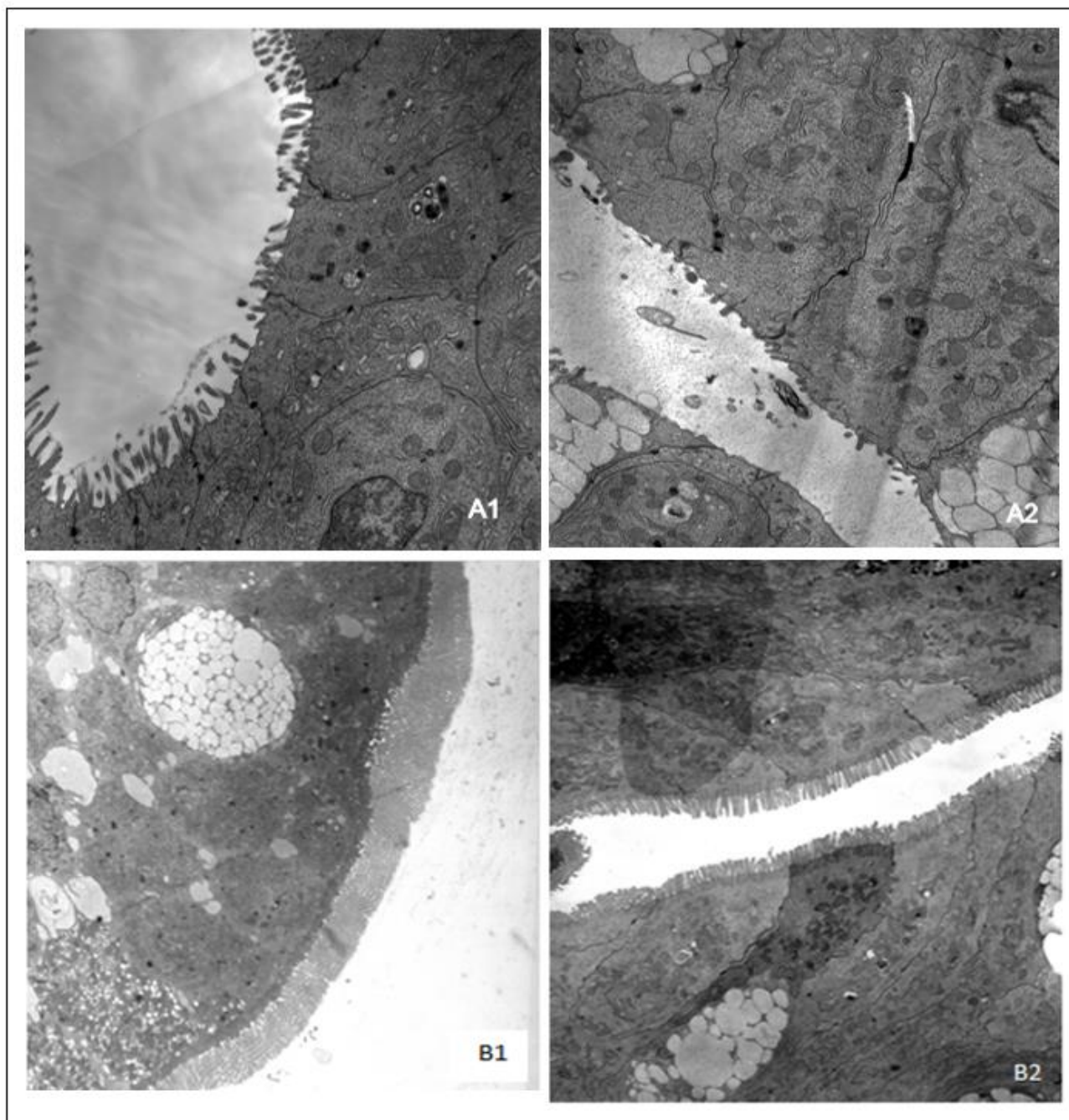


Figura 9. Microscopia eletrônica realizada em amostras de pacientes com DECHa (A1 e A2) e em controles (B1 e B2), mostrando a redução das microvilosidades apicais dos enterócitos no material pertencente ao paciente com DECHa. Aumento de 6.000X em A1 e A2. Aumento de 2.000X em B1 e B2.

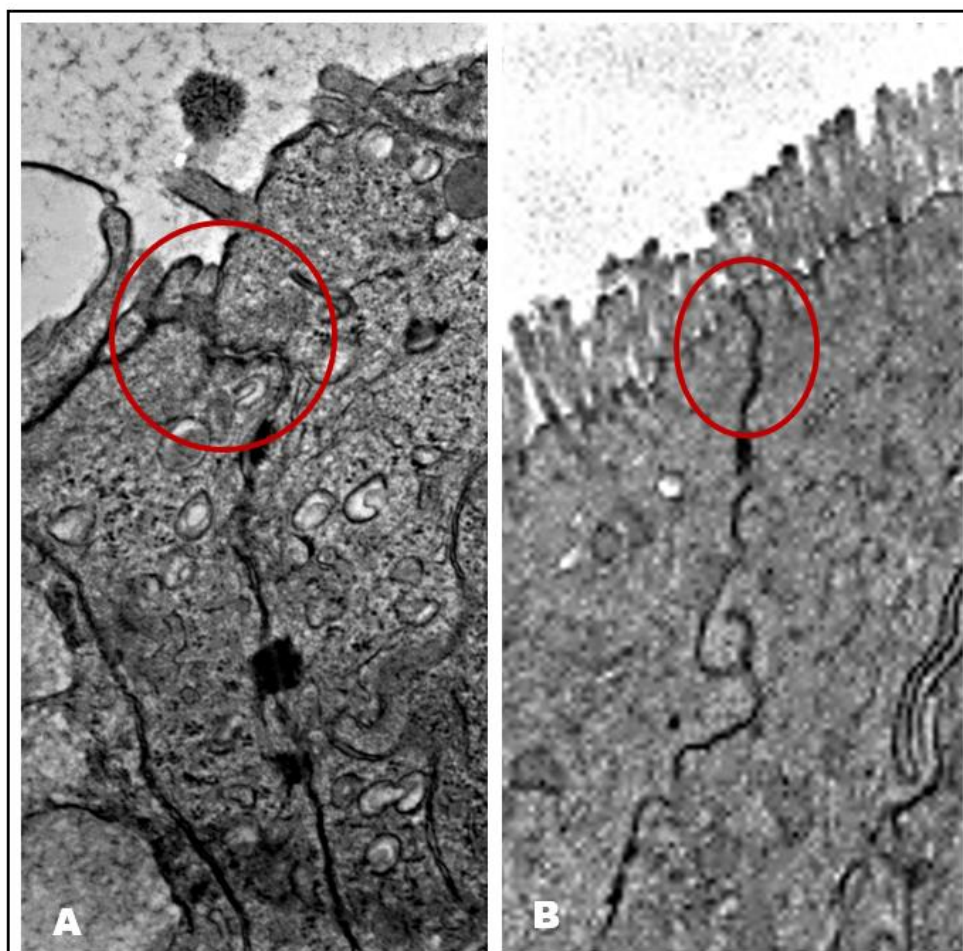


Figura 10. Microscopia eletrônica realizada em amostra de pacientes com DECHa (A) e controle (B). Em destaque as regiões das junções *tight* evidenciando o aumento da barreira epitelial intestinal na amostra pertencente ao pacientes com DECHa. Aumento de 6.000X.

4.5. Níveis séricos de Zonulina

Devido à hipótese que a Zonulina represente um marcador importante da função das JT optamos por realizar a dosagem desta molécula em pacientes de nossa coorte prospectiva. Estes resultados foram realizados na primeira etapa deste projeto, pela aluna e colaboradora deste projeto, Carolina Costa-Lima, cujo mestrado abordou fatores de risco para a DECHa GI.

A análise foi feita de forma separada em amostras obtidas antes do TCTH (basal) e no dia zero. Um potencial papel de níveis elevados de zonulina como preditor associado a DECHa foi avaliado através da comparação dos níveis entre pacientes com ou sem DECHa (pacientes submetidos a TCTH alogênico no mesmo período, mas sem DECHa) (Figura 11). A evolução dos níveis seriados de Zonulina nos pacientes com DECHa é mostrada na figura 12. Podemos observar que não há diferença nos níveis de Zonulina entre pacientes com ou sem DECHa GI, em nenhum dos momentos estudados. Observamos ainda que não há aumento da Zonulina durante o TCTH nos pacientes com DECHa GI, sendo observado inclusive uma redução discreta nestes níveis entre os valores basais e os valores obtidos no dia + 10. Estes resultados foram confirmados com outro kit de Elisa, e, além disso, confrontados com a dosagem de haptoglobina (sem achado de qualquer correlação) como forma de excluir a possibilidade de reação cruzada do anticorpo (dados não mostrados).

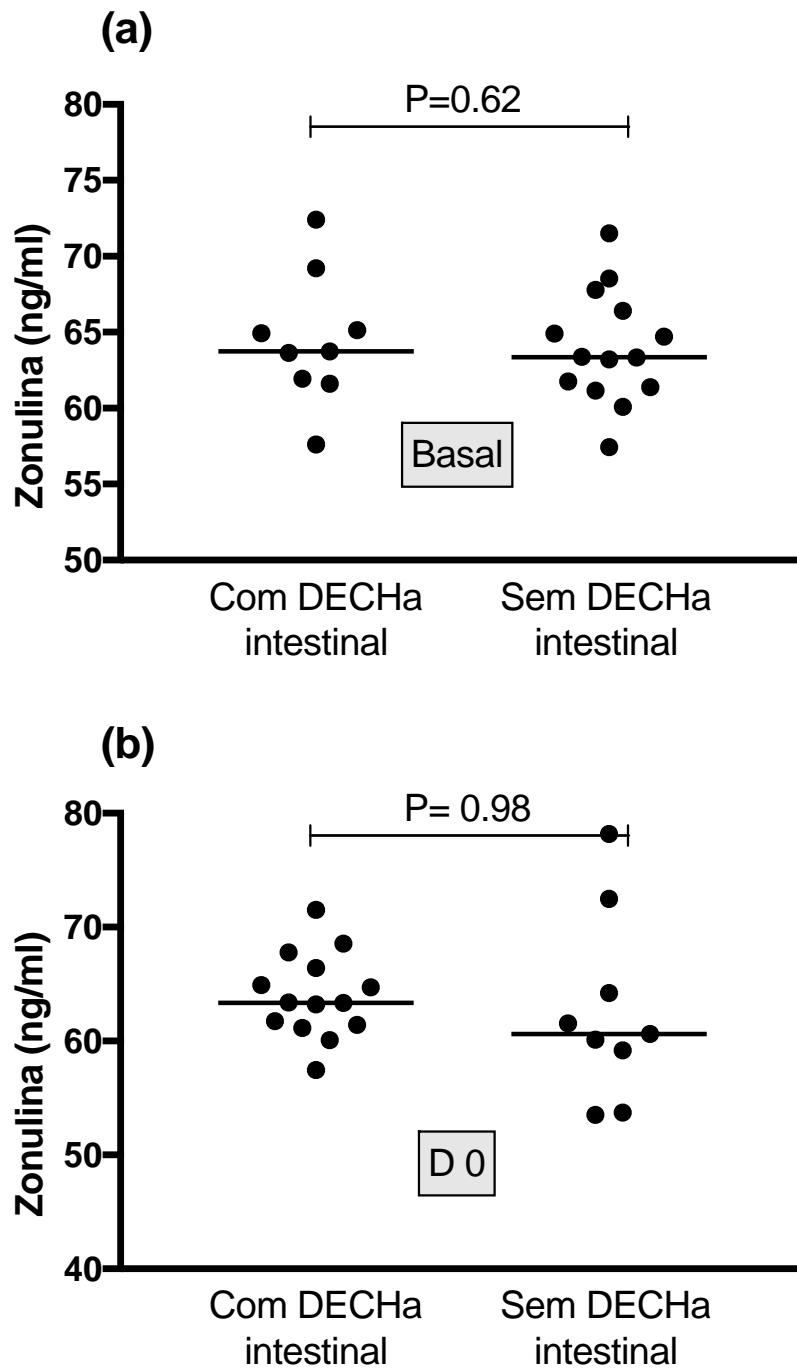


Figura 11. Níveis de Zonulina em pacientes com e sem DECHa GI, antes do início do condicionamento (Basal) e no dia 0 (data da infusão). Teste de Mann-Whitney.

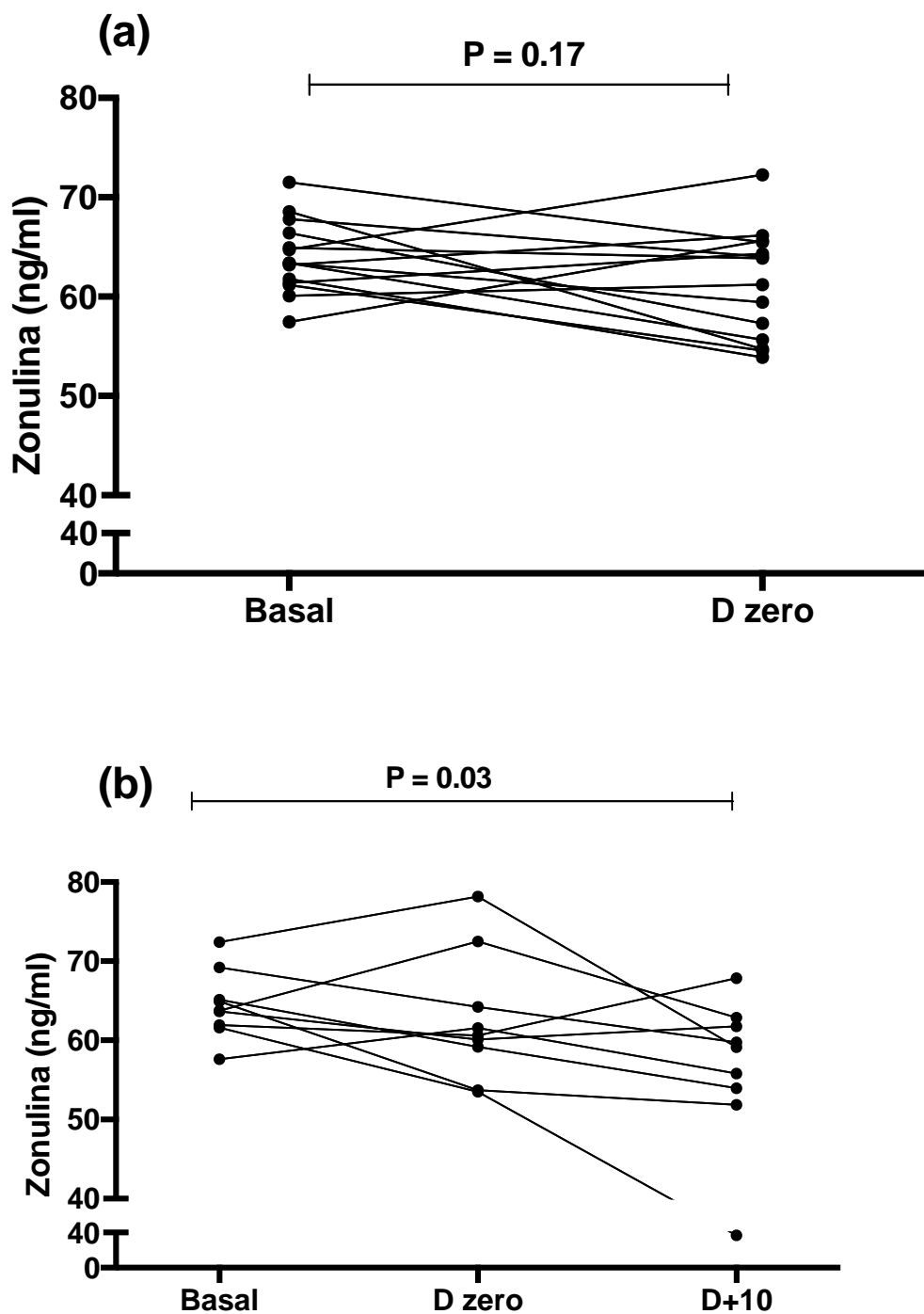


Figura 12. Evolução temporal dos níveis de Zonulina em controles sem DECHa (a) e em pacientes com DECHa GI (b). Não observamos qualquer tendência de aumento nos níveis de zonulina em pacientes com ou sem DECHa durante o curso do TCTH (Wilcoxon test).

4.6. Avaliação da permeabilidade epitelial induzida pelo soro de pacientes com DECHa

Como já detalhado, esta avaliação foi feita pela técnica de mensuração da TEER com voltímetro manual.

Inicialmente, com o objetivo de confirmar a validade deste modelo, realizamos ensaios utilizando estímulos que de acordo com a literatura são capazes de induzir quebra da barreira epitelial intestinal neste modelo. Para tal, utilizamos o TNF- α e IFN- γ , e observamos uma queda significativa do TEER após 2 horas de estímulo, quando os dois agentes foram usados de forma conjunta. Estes dados foram confirmados em três experimentos independentes (Figura 13). Após 4 horas do estímulo, a diferença persistia em valores absolutos, embora sem significância estatística (Figura 14). Além disso, o efeito de redução da TEER normalizada induzido por estes agentes foi confirmado em uma série de outros experimentos utilizando um protocolo modificado, em que o agente era aplicado apenas no compartimento apical dos insertos porosos (dados não demonstrados).

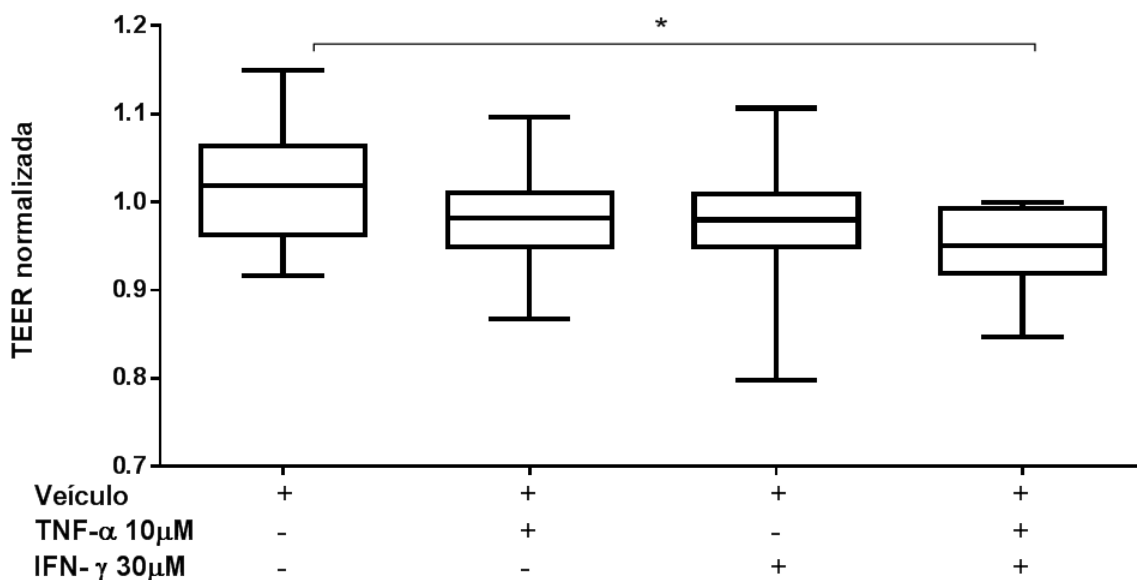


Figura 13. Ação do TNF- α e do IFN- γ nas mudanças da resistência transepitelial. Leitura da TEER realizada após 2h com estímulos. * $p \leq 0,05$.

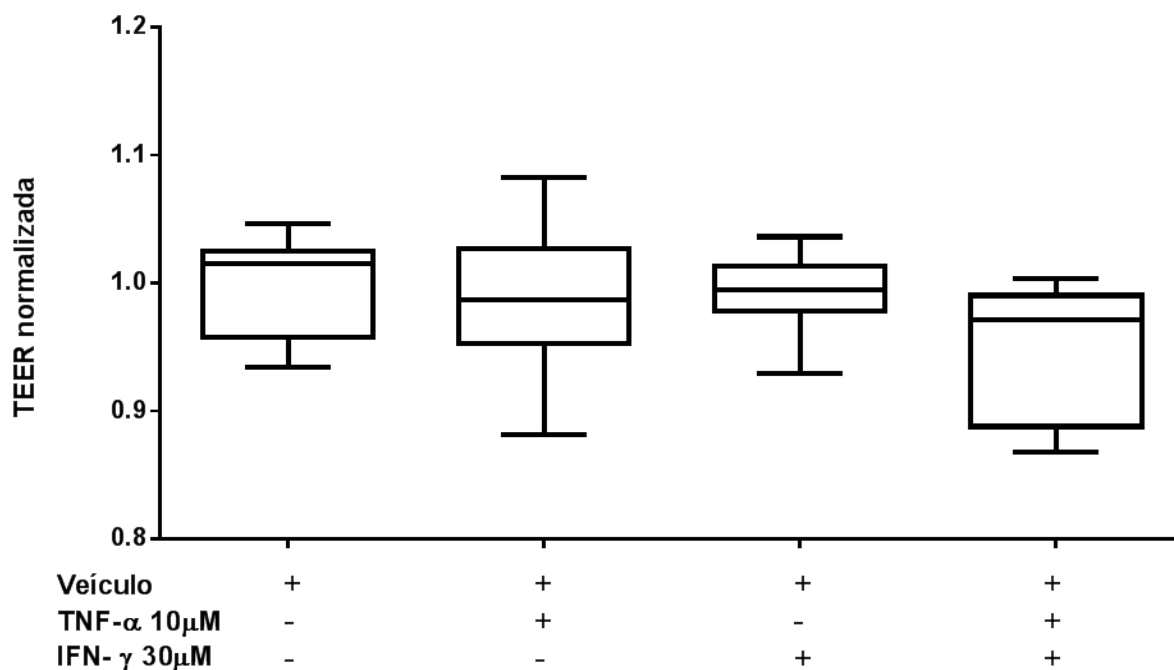
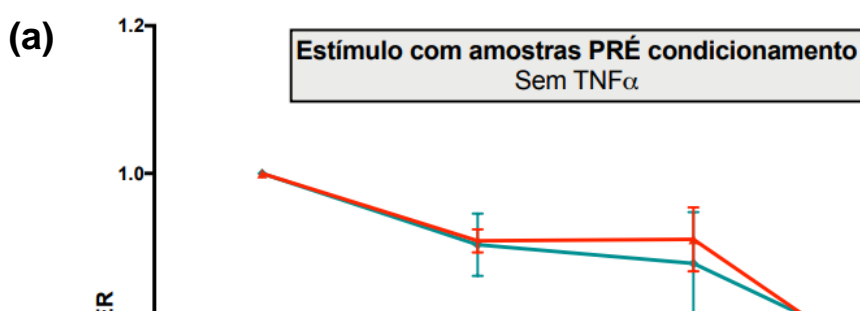


Figura 14. Ação do TNF- α e do IFN- γ nas mudanças da resistência transepitelial. Leitura da TEER realizada após 4h com estímulos.

A partir destes resultados, realizamos os experimentos com as amostras de pacientes, analisando os resultados nos tempos +2, +4 e +6 horas. Como mostrado na figura 15, não observamos diferenças significativas quando as monocamadas foram estimuladas com soro de pacientes com ou sem DECHA coletado antes (PRÉ) após (PÓS) o condicionamento, por até 6 horas após o estímulo. Estes resultados ocorreram independente do protocolo de adição do soro nos compartimentos das placas de cultura, que é um parâmetro relevante neste modelo (29,96). Os resultados mostrados na figura 15 correspondem aos experimentos realizados com colocação do soro nos dois compartimentos (apical e basal). Também não encontramos diferenças no mesmo experimento aplicando o soro apenas na porção apical dos poços (dados não demonstrados).



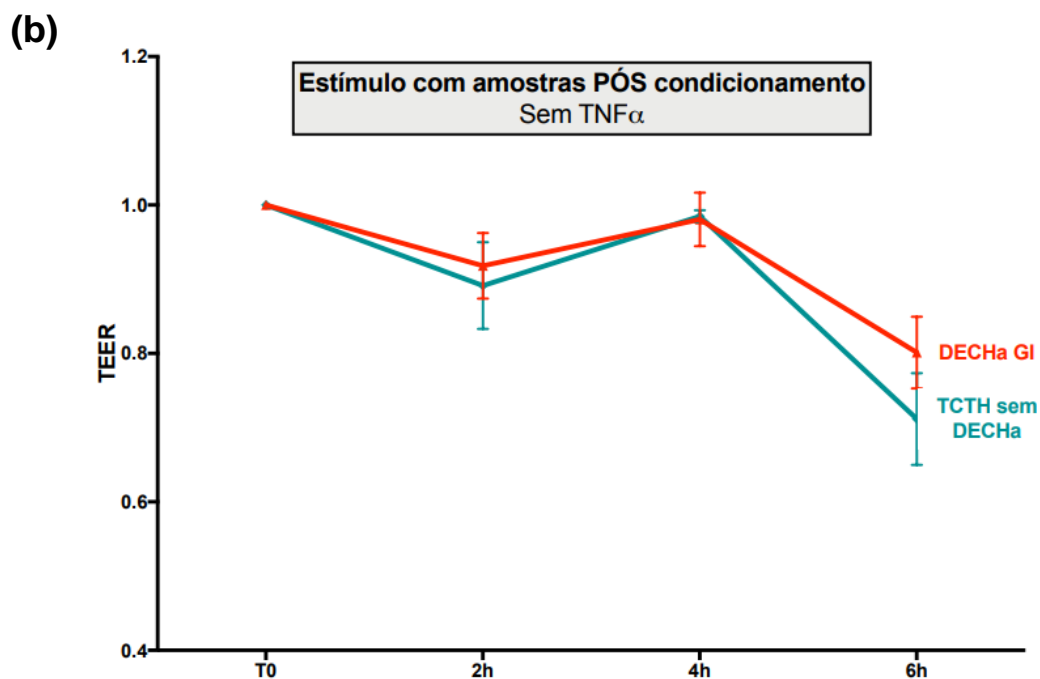


Figura 15. Monocamadas de Caco-2 incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles sem DECHa coletadas (a) antes do condicionamento e (b) após o condicionamento. O gráfico mostra a evolução da resistência transepitelial (TEER) após 2 horas, 4 horas e 6 horas da adição do soro. Teste de Mann-Whitney aplicado em cada tempo de análise comparando pacientes e controles. Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. Controles: n=5; DECHa: n=8.

Com base em uma nova revisão da literatura (74), e com o objetivo de refinar esta análise, optamos por realizar um pré tratamento das células com TNF- α (10 μ M) por 2 horas, com o objetivo de mimetizar o ambiente inflamatório encontrado na clínica, e de estender o tempo de avaliação para 96h. Utilizando este protocolo, também não observamos diferenças entre a TEER de células estimuladas com o soro de pacientes com ou sem DECHa independente do momento de coleta (Figura 16).

Em seguida, analisamos os mesmos resultados usando a alteração observada na TEER após a adição do soro coletado após o condicionamento, tendo como referência a TEER obtida após o estímulo com o soro coletado antes do TCTH (variação na TEER entre os dois momentos de coleta). Com esta análise foi possível observar que o soro de pacientes com DECHa retarda a recuperação da TEER quando comparado com o soro de pacientes controles (sem DECHa) (Figura 17). Esta observação foi feita nas células pré-tratadas com TNF e com período de observação de 96 horas. Infelizmente, no momento da realização destes experimentos, não dispúnhamos mais de amostras de controles experimentais coletadas no D10.

1.6

Estímulo com amostras PRÉ condicionamento
Com TNF α

(a)

(b)

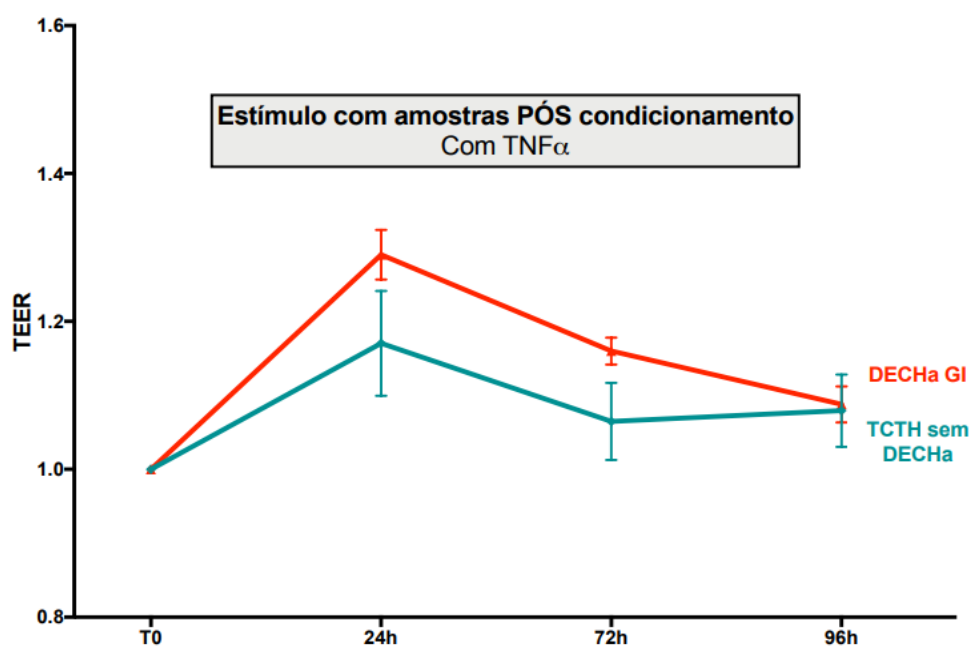


Figura 16. Monocamadas de Caco-2 com pré tratamento com TNF- α (10 μ M) por 2 horas e incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles sem DECHa coletadas (a) antes do condicionamento e (b) após o condicionamento. O gráfico mostra a evolução da resistência transepitelial (TEER) monitorada por 96h após a adição do soro. Teste de Mann-Whitney foi aplicado em cada tempo de análise comparando pacientes e controles. Valores apresentados como mediana \pm desvio padrão. Controles: n=5; DECHa: n=9.

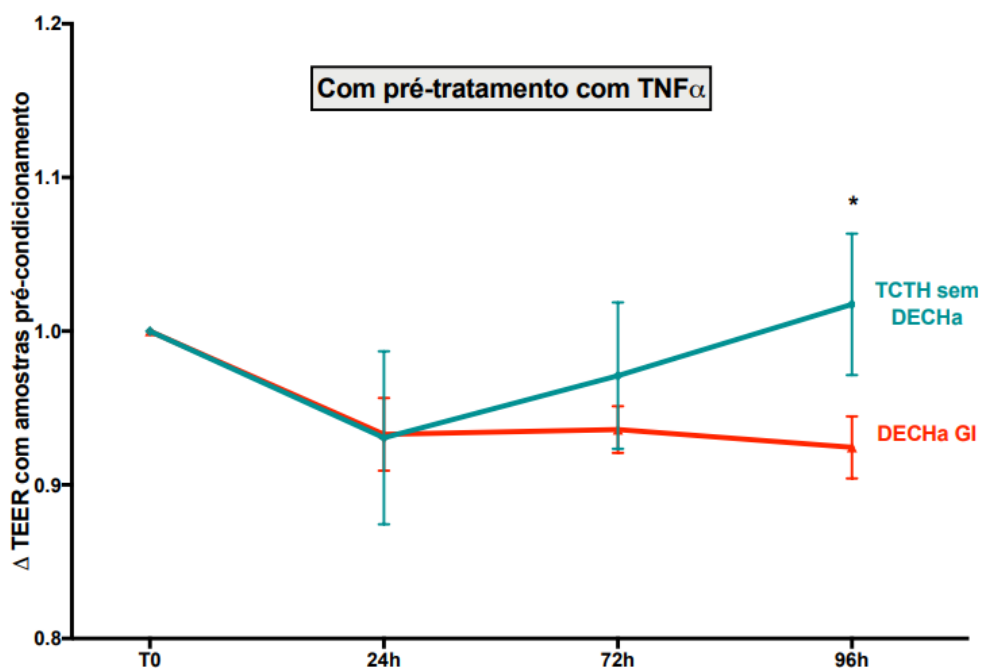


Figura 17. Monocamadas de Caco-2 pré tratadas com $\text{TNF-}\alpha$ ($10\mu\text{M}$) por 2 horas e após incubadas com amostras de soro de pacientes com DECHa GI e controles sem DECHa coletadas. O gráfico mostra a variação da resistência transepitelial (TEER) monitorada por 96h após a adição do soro coletado após o condicionamento, tendo como referência a TEER medida com o soro pré-condicionamento (pré-TECTH). Teste de Mann-Whitney foi aplicado em cada tempo de análise comparando pacientes e controles. Valores apresentados como mediana \pm desvio padrão. Controles: n=5; DECHa: n=9. *P=0,04.

4.7. Avaliação das alterações estruturais nas JT em células Caco-2 estimuladas com soro de DECHa

De forma análoga aos experimentos funcionais, o passo inicial foi tentar documentar o efeito do TNF- α 10 μ M e IFN- γ 30 μ M (estímulo de 2 horas) sobre a morfologia das JT. Como mostrado na figura 18, é possível observar na IF com marcação para a proteína ZO-1 a formação de desarranjo nas junções intercelulares nas células tratadas com TNF- α e IFN- γ (Figura 18), o que foi considerado como validação (controle positivo) do método de análise.

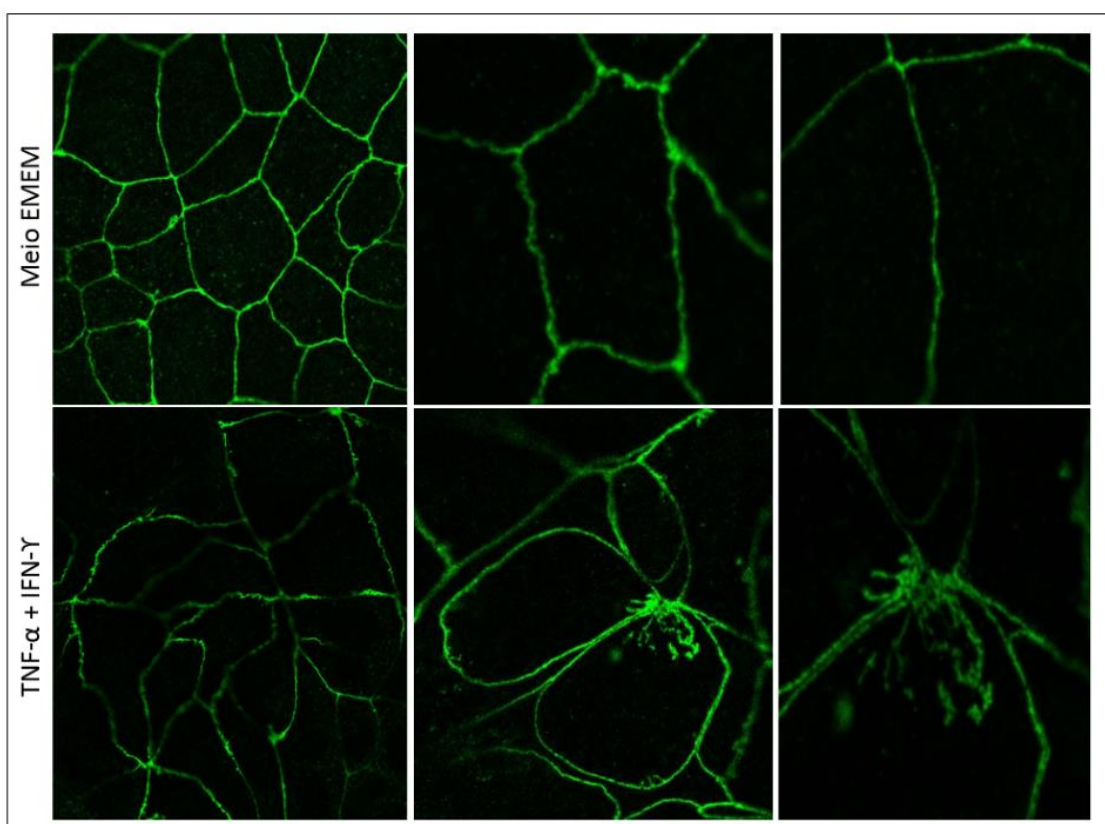


Figura 18. Efeito sinérgico do TNF- α e IFN- γ induz modificação na arquitetura das junções intercelulares. As células da linhagem Caco2 foram tratadas com meio ou TNF- α e IFN- γ durante 2 horas e então foram coradas para o marcador de JT ZO-1.

Em seguida, a análise das monocamadas celulares estimuladas com o soro com amostras de pacientes com DECHa GI pós-condicionamento (n=3), analisadas por microscopia confocal, revelou um desarranjo nas regiões

intercelulares detectadas pelos marcadores da proteína ZO-1. Este ensaio é complementar ao ensaio de permeabilidade, e na literatura é normalmente reportado como um resultado qualitativo. Na figura 19 mostramos resultados representativos obtidos mediante a incubação de células com soro controle e com soro de pacientes com DECHa GI. Nota-se com relativa facilidade o desarranjo das junções intercelulares nas células estimuladas com soro de um paciente sem DECH. Os experimentos foram realizados em duplicata, em 3 momentos independentes, e utilizando amostras de pacientes e controles distintos.

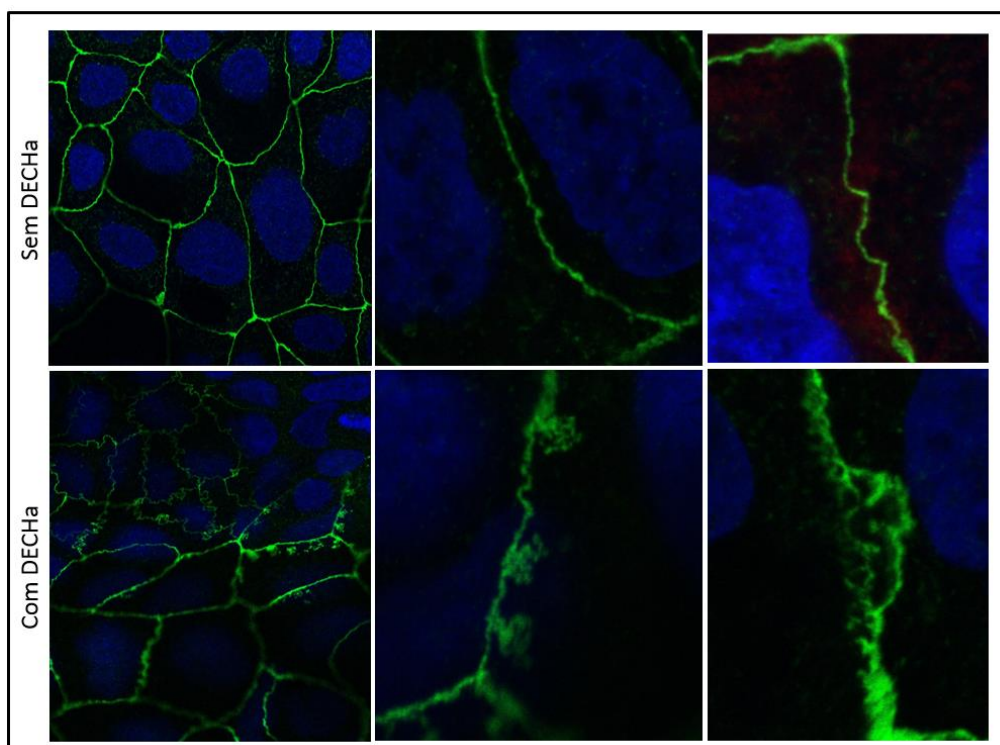


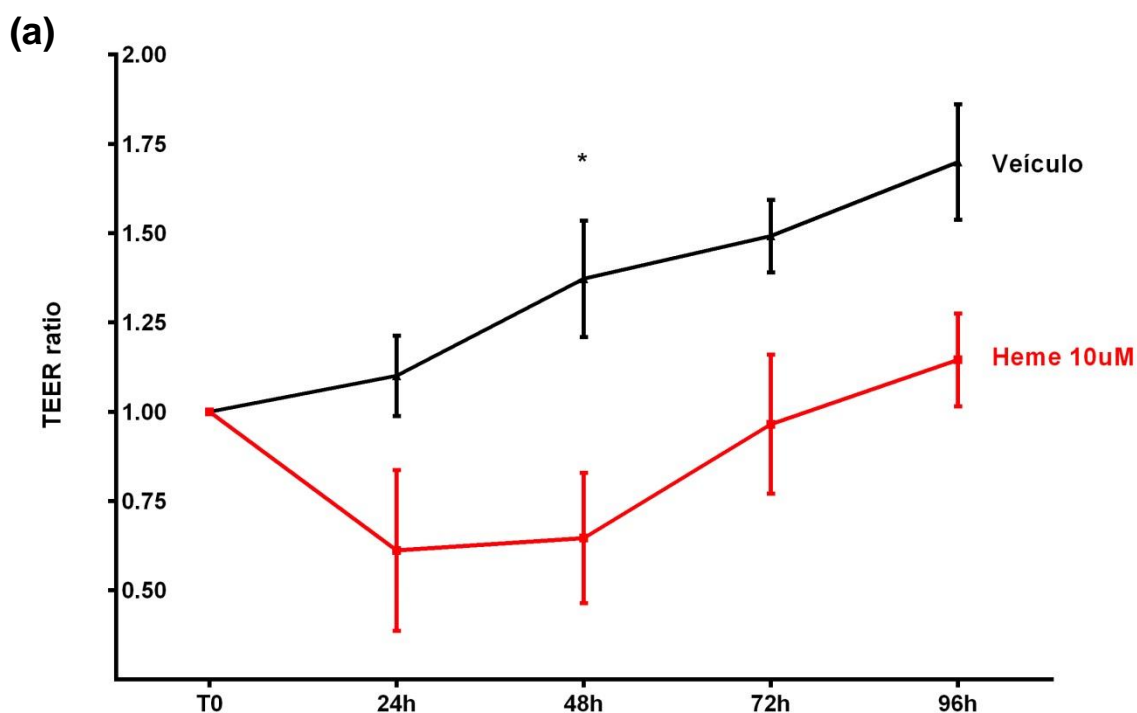
Figura 19. Imagem ilustrativa do efeito do soro humano na morfologia da monocamada epitelial. Foto de microscopia confocal de culturas de células Caco-2 estimuladas por 2 horas com soro de indivíduo controle e de pacientes com DECHa diluído 20% v/v com meio EMEM. Imunofluorescência com anticorpos anti-ZO-1 em diluição 1:500. No painel superior, as junções intercelulares mostram-se íntegras. No painel inferior, nota-se o desarranjo das junções. Linhagem C2BBe1.

4.8. Avaliação da permeabilidade de monocamadas de células Caco-2 estimuladas por heme

Conforme já detalhado, estas análises utilizaram uma outra plataforma para mensuração da TEER, baseada no adaptador trans-filtro ECIS® (Electric Cell-substrat Impedance Sensing, Applied BioPhysics, Troy, NY).

Inicialmente as células foram estimuladas com heme ou veículo e a TEER monitorada de forma contínua por 96 horas. Na figura 20 podemos observar uma redução da TEER nas células expostas ao heme nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M quando comparado ao veículo após 24 horas do estímulo.

Com base em evidências de que o heme e o LPS podem atuar de forma sinérgica sobre macrófagos (75), e considerando o efeito esperado do LPS sobre a barreira epitelial intestinal (74), optamos por avaliar o efeito potencializador entre estes dois agentes sobre a TEER. Conforme demonstrado na figura 21 a ação do efeito sinérgico do heme e LPS nas mudanças da resistência. O tratamento sinérgico com heme e LPS diminui a resistência elétrica transepitelial (TEER).



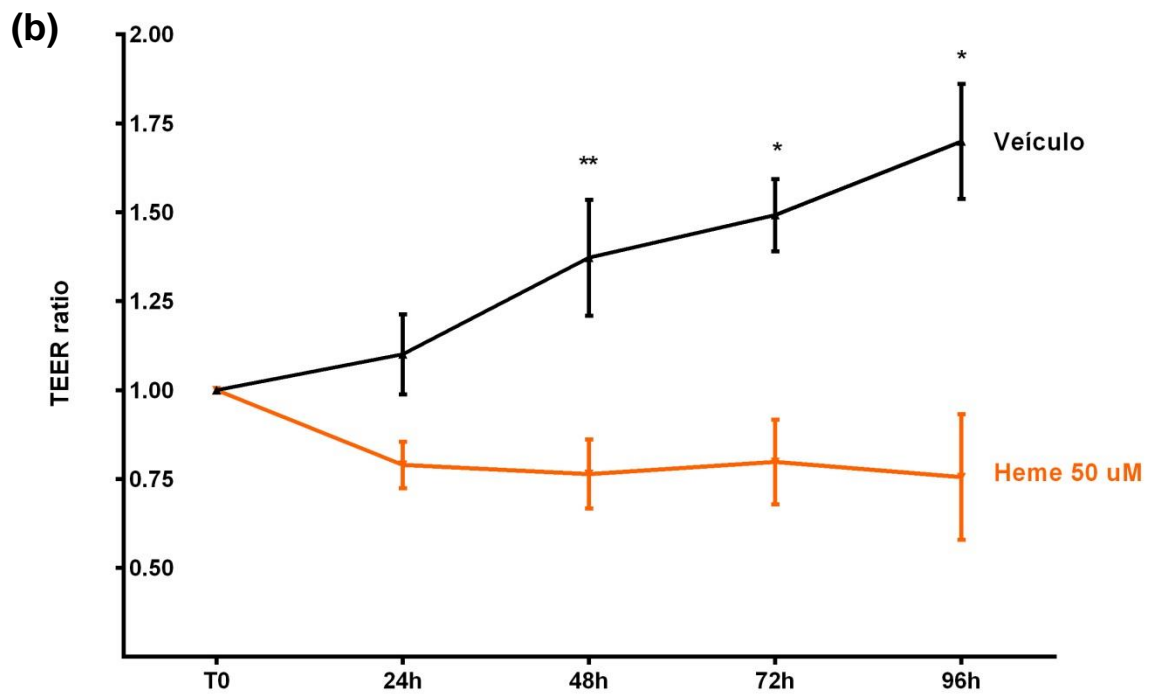


Figura 20. Monocamadas de células C2BBE1 incubadas com heme. Leitura da TEER realizada com 250Hz. Ação do heme 10 uM ou 50 uM nas mudanças da resistência transepitelial. *p ≤ 0,05. **p < 0,01.

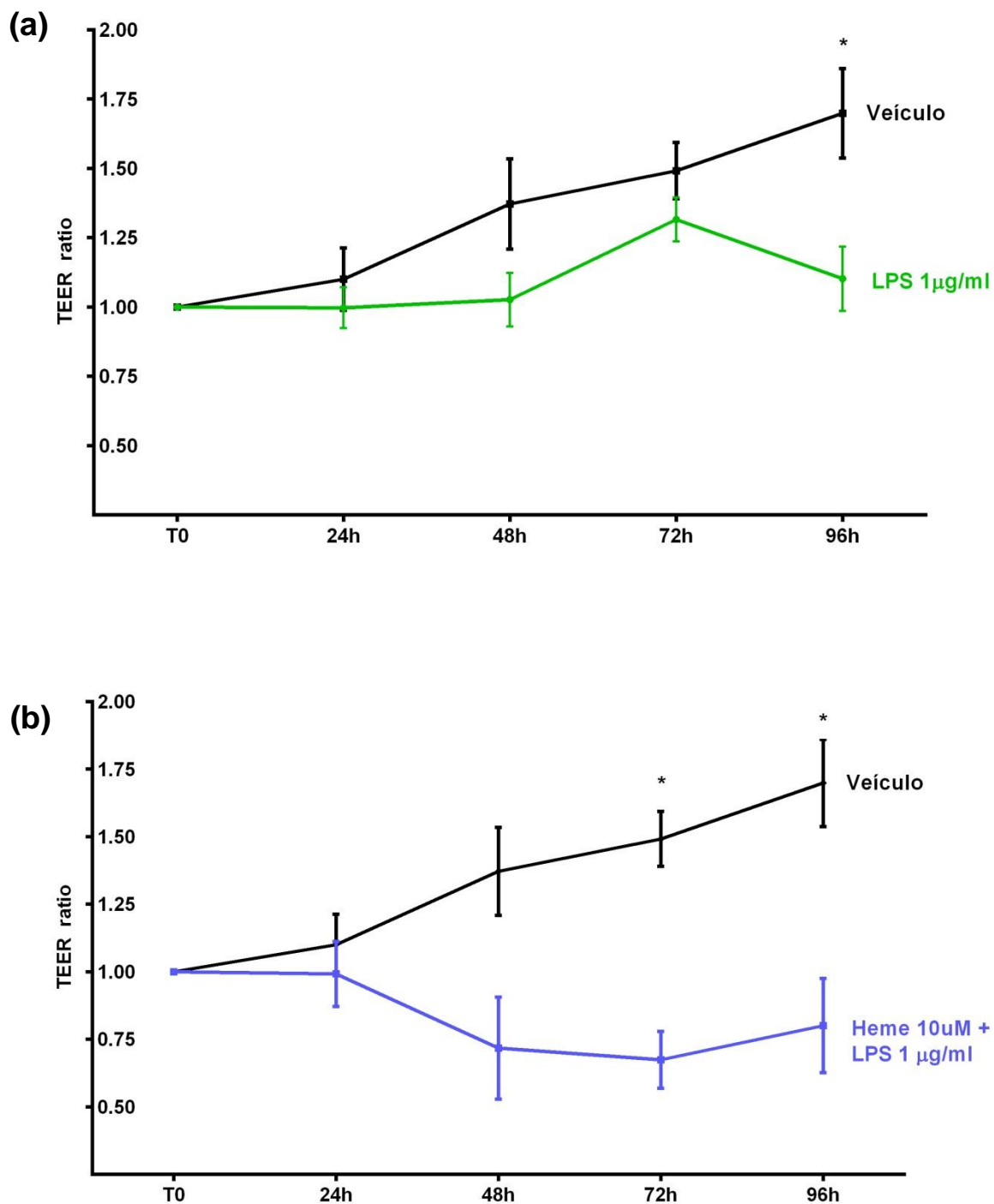


Figura 21. Monocamadas de células C2BBE1 incubadas com LPS 1µg/ml e/ou heme 10 uM. Leitura da TEER realizada com 250Hz. O tratamento com heme e LPS possui efeito mais proeminente sobre a barreira epitelial do que cada um destes agentes individualmente. *P ≤ 0,05.

4.9. Avaliação das alterações morfológicas nas JT induzidas pelo heme

Para avaliar as alterações morfológicas causadas pelo efeito do heme e LPS, as células da linhagem C2BBE1 foram estimuladas com heme 50 μ M ou heme 10 μ M + LPS 1 μ g/ml para a avaliação do efeito sinérgico.

Na Figura 22 são apresentadas as imagens obtidas após a realização da IF utilizando o anticorpo anti-ZO-1. É possível observar uma marcação menos evidente e com desarranjos nas regiões paracelulares nas monocamadas de células epiteliais estimuladas com heme 50 μ M e heme 10 μ M+ LPS 1 μ g/ml.

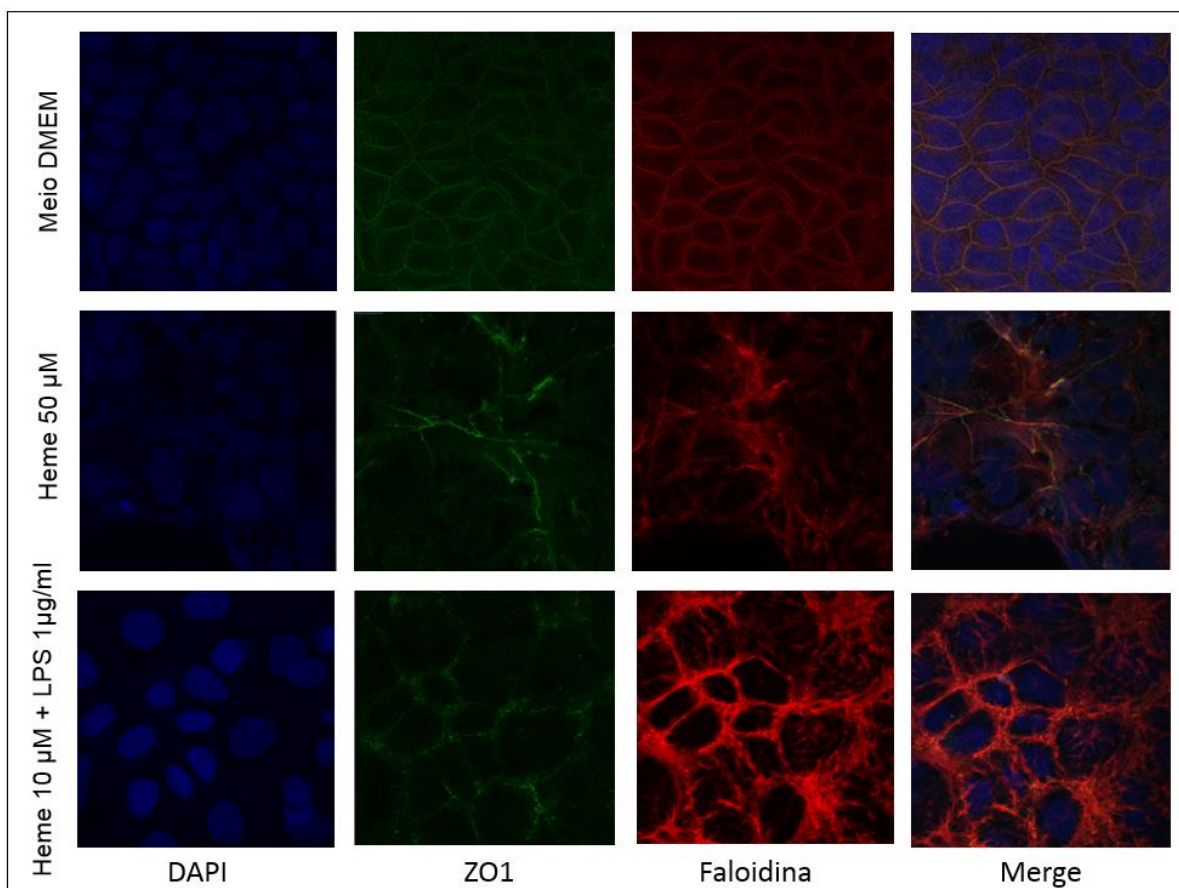


Figura 22. Efeito do heme 50 μ M e heme 10 μ M com adição do LPS 1 μ g/ml na morfologia da monocamada epitelial. Foto de microscopia confocal de culturas de células estimuladas por 72 horas. Imunofluorescência com anticorpos anti-ZO-1 em diluição 1:500. No painel superior, as junções intercelulares mostram-se íntegras. Nos 2 painéis inferiores, nota-se o desarranjo das junções. Linhagem C2BBE1.

Na figura 23 é demonstrado a sequência de imagens obtidas com o *Time Lapse*, em que cada lâmina foi avaliada por 30 minutos após a adição dos estímulos e as imagens foram registradas a cada 2 minutos. Em concordância com a TEER realizada com os mesmos estímulos, é possível observar alterações nas áreas de junções com formação de regiões atróficas e distorções intercelulares (Figura 23).

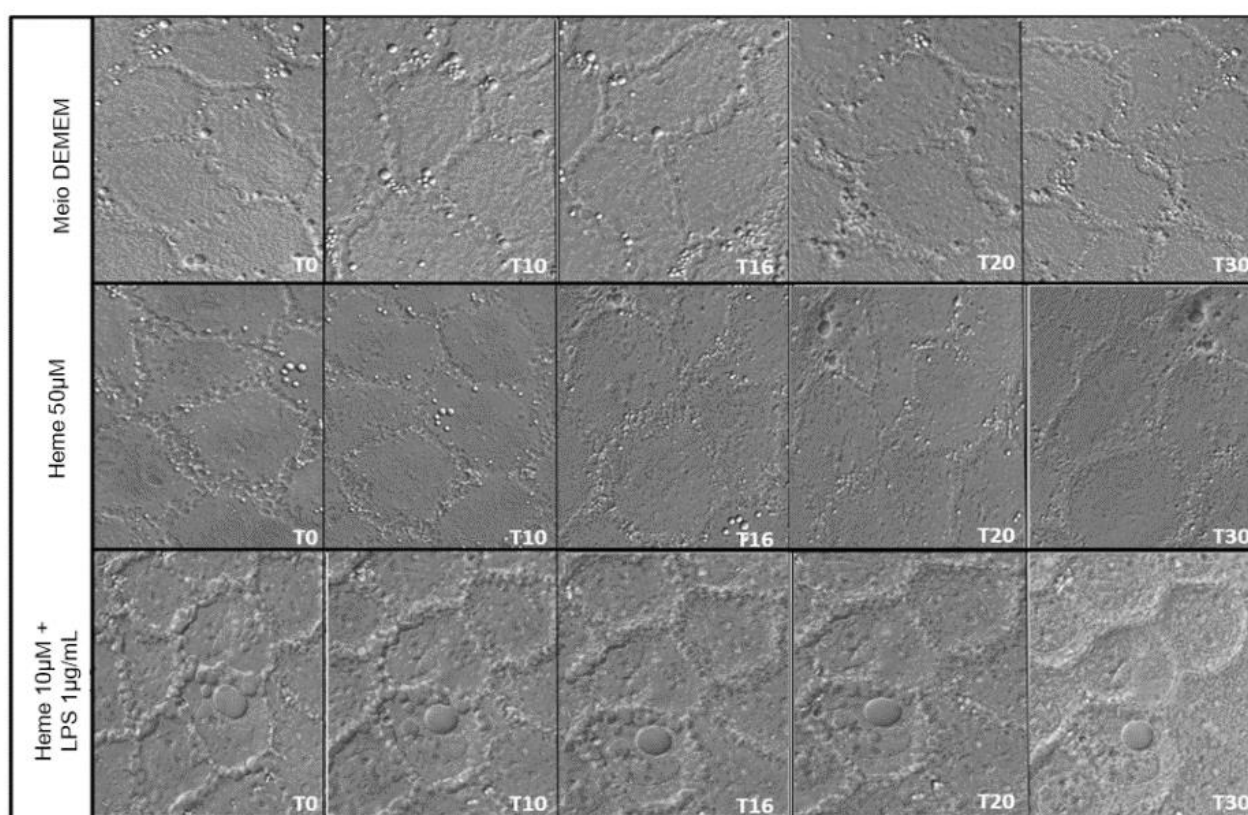


Figura 23. Efeito do heme 50µM e da combinação entre heme 10µM+LPS 1 µg/ml induzindo alterações na arquitetura das junções intercelulares. As células da linhagem C2BBE1 foram estimuladas por 30 minutos e as imagens foram realizadas em tempo real após a estimulação.

5. DISCUSSÃO

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para a investigação da fisiopatologia da DECHa GI, procurando aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de quebra da barreira epitelial na sua gênese. Ao formularmos esta pergunta, esperávamos ainda identificar potenciais alvos terapêuticos pouco explorados para esta que segue como a principal causa de mortalidade após o TCTH alogênico (97). Nossas principais contribuições foram a demonstração em amostras de pacientes do comprometimento das JT nesta patologia, a demonstração de que ao longo do processo de condicionamento o soro destes pacientes acumula elementos capazes de interferir na integridade destas junções, com possíveis consequências funcionais sobre a barreira epitelial, e que estes efeitos não são mediados pela Zonulina. Além disso, em um braço independente do projeto também confirmamos o efeito do heme sobre a integridade da barreira epitelial intestinal utilizando uma metodologia mais robusta, além de demonstrarmos o efeito sinérgico entre heme e LPS neste processo. A seguir discutiremos cada um destes itens.

5.1. Alterações morfológicas e a gravidade clínica na DECHa GI

Para realização deste projeto, o primeiro passo foi uma avaliação panorâmica das alterações morfológicas observadas à histologia clássica em uma coorte retrospectiva de pacientes com DECHa GI acompanhada em nosso serviço. Esta etapa nos permitiu realizar uma comparação dos achados histopatológicos associados à DECHa GI de nossa população com aquela descrita na literatura, além de explorar sua associação com características clínicas da DECHa GI. Embora este não fosse o cerne de nossa pergunta, a caracterização permitiu ainda a validação de um achado descrito há mais de 10 anos e que associada a perda grave de criptas com a gravidade da DECHa GI e resultou em uma publicação relacionada ao projeto.

A caracterização de alterações específicas da DECHa em biópsias gastrointestinais de pacientes submetidos ao TCTH é desafiadora devido à coexistência de várias condições que podem resultar em patologia gastrointestinal. O espectro dessas alterações incluem a mucosite relacionada ao tratamento, que é mais frequente nas primeiras 2-3 semanas após o TCTH,

infecções oportunistas e colite associada a imunossupressores. Como a DECHa geralmente se manifesta após a terceira semana de TCTH, o diagnóstico diferencial da mucosite induzida por quimioterapia é menos complexo. Por outro lado, a infecção por citomegalovírus (CMV) é uma complicação muito prevalente após o TCTH, cujo o tempo de apresentação se sobrepõe ao da DECHa. A infecção pelo CMV apresenta-se no período de 100 dias após o transplante (97), que é o período em que a DECHa é mais prevalente. As limitações da avaliação histológica desses casos são ilustradas por estudos que demonstram que somente a infecção pelo CMV é considerada suficiente para causar apoptose de células epiteliais intestinais (98,99), bem como pela recente demonstração de que a infecção pelo CMV pode ser identificada por técnicas de biologia molecular em amostras sem inclusões virais típicas, ou mesmo imunopositividade para CMV (100). Em nossa coorte, infecção concomitante por CMV foi diagnosticada em 11/22 (50%) dos pacientes com base em antigenemia e PCR. Entre esses pacientes, os achados histológicos sugerindo infecção por CMV foram relatados em 7/11 pacientes. Como não foram realizadas técnicas adicionais capazes de refinar o diagnóstico diferencial dessas condições, como imunohistoquímica ou reação em cadeia da polimerase, não podemos discutir o impacto da infecção pelo CMV em nossos resultados. O micofenolato mofetil (μ MF) não foi usado com frequência em nossos pacientes, e não esperamos que a colite associada ao μ MF seja um fator de confusão relevante em nosso estudo.

A apoptose de células epiteliais é a principal característica histológica da DECHa GI, especialmente quando observada em áreas mais profundas (proliferativas) de criptas intestinais (98). O sistema usado para classificar as alterações histológicas na DECH baseia-se na presença de apoptose de células epiteliais e perda de criptas (98). Existe controvérsia sobre o número de células apoptóticas que devem ser identificadas para apoiar o diagnóstico da DECH do TGI, e em outros critérios mínimos para apoiar este diagnóstico. Nguyen e cols. avaliaram retrospectivamente 85 biópsias de pacientes com DECHa GI e concluíram que um único corpo apoptótico é suficiente para apoiar o diagnóstico dessa condição, em pacientes com DECH da pele associada (101). Em contraste, Lin et al demonstraram que a presença de seis ou menos corpos apoptóticos por 10 criptas contíguas não foram suficientes para apoiar o

diagnóstico de DECH do TGI, embora um alerta aos médicos sobre essa possibilidade tenha sido recomendado pelos autores (100). Estudos recentes que tentaram estimar a precisão relativa de várias alterações observadas nesses pacientes, identificaram a apoptose intracriptal como o indicador mais confiável da DECH do TGI, em particular quando associada a outras alterações mais presentes em pacientes com DECHa GI do que em pacientes com sintomas gastrointestinais não relacionados à DECHa (102). Essas alterações adicionais mais frequentemente associadas a DECH do TGI incluem apoptose pericriptal, criptas dilatadas, distribuição irregular das criptas, diminuição do número de linfócitos, aumento da rede de microvasos, fibrose, presença de macrófagos, ulceração da mucosa e/ou redução da espessura da mucosa. O documento atualizado do Consenso do NIH sobre o diagnóstico patológico da DECHa gastrointestinal reconhece essa falta de definição e questiona os benefícios da graduação da DECHa GI (103). Em nossa amostra, corpos apoptóticos estavam presentes em 80%, 40% e 20% dos pacientes no duodeno, íleo e cólon, respectivamente, e foram fundamentais para o diagnóstico da DECH do TGI.

Também existe controvérsia sobre a associação entre os achados histológicos com a gravidade clínica, com demonstrações limitadas da presença de tais associações. Em 2004, em um estudo retrospectivo com 95 pacientes submetidos à biópsia gastroduodenal, Socie et al demonstraram que a presença de cinco ou mais corpos apoptóticos por campo, ou 20 ou mais neutrófilos dentro do infiltrado celular, estava associada a MRT (104). Mais recentemente, a perda das células de Paneth, contada em cortes corados com HE, em pelo menos três campos (40x) de alta potência na área com a maioria das células de Paneth, também foi identificada como um marcador de mau prognóstico na DECH GI (105). Interessante destacar que a contagem destas células utilizando apenas o HE não se revelou tão simples e factível em nossas mãos como na descrição original, motivo pelo qual não pudemos relatar este resultado. Por outro lado, uma alteração histológica frequente e de caracterização relativamente objetivo na DECHa GI é a presença de perda severa da cripta. Melson e cols., em 2007, também demonstraram que a presença dessa alteração, que corresponde às alterações histológicas graus III-IV, estava associada à DECHa refratária a corticoterapia e a mortalidade em uma coorte de 23 pacientes submetidos à

colonoscopia (95). Até onde sabemos, o estudo não havia sido validado em uma população independente, e aproveitamos nossa coorte para testar esta hipótese. Em nossos pacientes, as alterações histológicas não foram diferentes daquelas comumente relatadas em outros estudos sobre a DECHa do TGI. Além disso, fomos capazes de mostrar que a perda severa da cripta está associada com maior volume de fezes e aumento da duração da diarreia, que são características clínicas sugestivas de maior gravidade. Embora não tenhamos encontrado uma associação com resposta a esteroides e mortalidade, o tamanho da nossa amostra talvez não tenha sido suficientemente grande para uma conclusão negativa sobre esta última associação.

5.2. O significado da quebra da integridade da barreira epitelial na DECHa GI

Como destacado na introdução, o modelo fisiopatológico da DECHa GI envolve a ativação de linfócitos T do doador por antígenos do receptor expostos principalmente durante a lesão tecidual decorrente do condicionamento. É neste contexto que a perda da integridade da barreira epitelial intestinal torna-se um elemento interessante para a fisiopatologia da DECHa. No momento em que formulamos as perguntas deste projeto, dados em modelos animais (57) e mesmo em humanos (17–19) já mostravam de forma bem clara que o aumento da permeabilidade intestinal ocorre no curso da DECHa, e sugeriam que ao menos em animais, as JT seriam participantes potenciais deste processo. Os dados em humanos foram obtidos utilizando o método de ⁵¹CrEDTA marcado em pacientes submetidos a TCTH e mostraram não apenas que a quebra da barreira epitelial ocorria entre dos dias +1 e +10, mas também que quanto maior, mais associada ao risco de DECHa. Além disso, mostraram que esta quebra de barreira era maior nos pacientes submetidos a condicionamentos mieloablativos (17–19).

Em tese, a quebra da barreira epitelial intestinal na DECHa GI pode representar um mecanismo relevante em duas fases distintas de sua fisiopatologia: (i) por um mecanismo mais direto, em que a quebra contribuiria para a ocorrência da diarreia secretora, pelo aumento da movimentação de soluto (e água) para o lúmen intestinal (106); e/ou (ii) pela facilitação da ativação do sistema imune, decorrente do aumento da passagem de antígenos e agentes nocivos (conhecidos como *Danger-associated molecular patterns* ou DAMPs e

de *Pathogen-associated molecular pattern* ou PAMPs) do lúmen intestinal para a submucosa (107).

Em relação à primeira hipótese, a destruição imunomediada da mucosa intestinal leva a uma falha de reabsorção de líquidos, particularmente no íleo, que pode contribuir para a diarreia volumosa em pacientes com DECHa, como já sugerido por alguns autores (108,109). Este comprometimento da mucosa no contexto de uma resposta inflamatória vigorosa pode levar à perda substancial de proteínas através da mucosa, levando o fluido para dentro do lúmen intestinal por meio da pressão oncótica. A associação entre a gravidade da perda proteica e a DECHa é sugerida por estudos que mostram que a redução da albumina é um fator prognóstico importante na DECHa GI (109). Por fim, é razoável supor que a alteração da microbiota local pela alteração da integridade da mucosa intestinal também contribua para desencadear e perpetuar a diarreia nestes pacientes (110–112).

Em relação à segunda hipótese, já destacamos que o modelo atual da fisiopatologia da DECHa baseia-se na premissa de que as células T do doador migram para os gânglios linfáticos e/ou para o órgão alvo do receptor, particularmente do trato gastrointestinal, onde interagem com células apresentadoras de antígenos (APCs) do receptor, as quais ocupam-se de apresentar antígenos do receptor oriundos do intenso dano tecidual decorrente do condicionamento pré-transplante. Neste contexto, a perda da integridade da mucosa intestinal intensificaria este processo, amplificando o efeito imunoestimulador do contato dos linfócitos T do doador com DAMPs e PAMPs (11,113). A propósito, este modelo pode conciliar observações recentes da influência da microbiota na apresentação clínica da DECHa (111,114). De fato, a microbiota intestinal foi reconhecida como relevante para a fisiopatologia da DECHa em um estudo seminal publicado nos anos 1970 que reportou que camundongos germ-free não apresentavam DECHa (115). Embora esta demonstração nunca tenha sido confirmada em humanos de forma consistente, dados mais recentes confirmam que variações na flora intestinal modulam a expressão clínica da DECHa (111,112,116), e já identificaram vias metabólicas criticamente alteradas por variações na microbiota que levariam a mudanças na ativação imune em modelos animais (117). Além disso, estas observações

motivaram estudos recentes com transplante fecal para tratamento da DECHa GI (118).

5.3. Participação das JT na fisiopatologia da DECHa GI.

Apesar deste avanço na compreensão do papel da quebra da barreira epitelial intestinal na DECHa GI, seus mecanismos não são claros, o que nos motivou a formular as perguntas deste estudo.

A permeabilidade da mucosa intestinal está intimamente relacionada com a integridade da barreira epitelial intestinal, que desempenha um papel importante na proteção do organismo na regulação da absorção de antígenos alimentares, microrganismos e seus metabólitos nocivos (119). A barreira da mucosa inclui barreiras mecânicas, imunológicas, químicas e biológicas, dentre as quais, a barreira mecânica que é essencial para manter a integridade da barreira intestinal. O arranjo desta barreira mecânica é principalmente composto por enterócitos e junções celulares. A função da barreira intestinal é afetada pela morfologia e número de células epiteliais e junções celulares (120). Três grupos de macromoléculas são considerados componentes integrantes das junções íntegras: ocludinas, claudinas e ZO-1 (121). A ZO-1 é a principal proteína da JT que se liga ao domínio intracelular das ocludinas (122). A interação entre ocludina e ZO-1 desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura das junções estreitas e da função de barreira epitelial (57,123). Portanto, a detecção da ZO-1 reflete a condição das JT e da barreira mucosa intestinal.

Alterações nas JT durante a DECHa Gi já haviam sido sugeridas em um estudo em modelo animal de DECHa GI (57), mas não em humanos. Em nosso estudo pudemos demonstrar alterações no arranjo usual das JT, utilizando a imunolocalização da ZO-1 e a microscopia eletrônica em amostras de pacientes com DECHa GI coletadas no momento do diagnóstico. Especificamente, a análise ultraestrutural das amostras de pacientes e controles possibilitou uma análise específica das alterações nas JT na DECHa GI. As imagens obtidas dos controles apresentaram uma membrana celular intacta, com a presença de microvilosidades com tamanho e arranjo homogêneo. Foi possível observar a organização das JT em forma de cinturão denso em elétrons e com expansão em torno do ápice das células epiteliais intestinais, compondo uma barreira resistente entre o lúmen e o tecido

intestinal. No entanto, a microscopia eletrônica das amostras dos pacientes com DECH GI, revelou estruturas das JT desarranjadas, com espaço intercelular alargado e microvilos espaçados com irregularidades no comprimento e no arranjo.

Este é um dos achados mais importantes de nosso estudo, que ademais complementa a caracterização morfológica da DECHa GI na literatura, na medida em que desconhecemos estudos progressos que tenham demonstrado estas alterações. Nossos achados de microscopia eletrônica também oferecem uma visão mais detalhada do estado da mucosa intestinal nestes pacientes.

Um aspecto importante é que é amplamente reconhecido que as JT não são estruturas estáticas, mas sim complexos proteicos dinâmicos regulados por vias celulares que envolvem entre outros, o TNF-alfa, o IFN-gama e a fosforilação da proteína MLC2 (28,29,96). A ação sinérgica destas duas citocinas sobre a quebra da barreira epitelial intestinal via MLC2 já foi demonstrada em diversos estudos(29). Neste contexto é possível levantar a hipótese que as alterações por nós observadas sejam não apenas uma simples consequência da destruição da mucosa por todo o processo do TCTH, mas sim reflexo da ativação imune local. Esta possibilidade é atrativa pois abriria espaço para a modulação desta alteração das JT por estratégias que modificassem estas alterações celulares como inibidores da ativação de citocinas, ou ainda, agentes que modificassem indiretamente o metaboloma local e interferissem na integridade da barreira. Algumas evidências a favor desta possibilidade incluem o impacto da diversidade da microbiota na ocorrência de DECHa GI (112), demonstrações de que metabólitos de algumas bactérias modulam a resposta imune local responsável pela DECHa GI em modelos animais (117), e o papel das células de Paneth (105) e de seus produtos antimicrobianos secretados como o REG3-alfa (124) são biomarcadores do risco de DECHa GI. Importante destacar que nossos dados de IF e ME não permitem concluir por uma ou outra hipótese. Embora tenhamos usado controles com diarreia por outras causas nos estudos de ME, não foi factível a comparação das alterações observadas nas JT com pacientes submetidos a TCTH e que não tenham desenvolvido DECHa GI pois

estes não apresentam indicação para um procedimento invasivo como a colonoscopia.

Neste contexto, ganha importância a demonstração de que o soro de pacientes que desenvolveram DECHa GI foi capaz de modificar a estrutura das JT em monocamadas de células epiteliais intestinais, ao contrário do soro de pacientes submetidos a TCTH que não desenvolveram DECHa GI. Embora o modelo sofra de todas as limitações de modelos celulares, esta foi a forma que nos pareceu mais factível de nos aproximar desta resposta.

Quanto aos resultados dos testes funcionais, optamos por utilizar um modelo amplamente utilizado para o estudo da integridade da barreira epitelial intestinal *in vitro* que é o baseado em células Caco-2 (88,89). Estas células possuem a capacidade de se diferenciar em enterócitos, e formar uma barreira estável após 18 a 21 dias de cultura (86,87). Em tempo, este longo período de cultura torna desafiador o trabalho com este modelo, cuja padronização não foi trivial, e demandou o uso de grandes volumes de amostras de pacientes. Apenas a título de ilustração, citamos a discussão sobre dois parâmetros destes protocolos: (i) o volume de estímulo em cada poço, que influencia sua difusão para toda a monocamada, e (ii) o local de aplicação dos estímulos, se nos compartimentos superior e inferior, ou apenas no inferior (comunicação pessoal com JR Turner). Estes dois parâmetros foram testados nas fases de padronização demandando tempo e insumos, incluindo amostras de pacientes. Como consequência, o esgotamento de algumas amostras, e o tempo necessário para esta padronização justificam a impossibilidade de realização de alguns experimentos adicionais que seriam de nosso interesse, e que representam limitações de nosso estudo. Em particular, os experimentos funcionais só puderam ser feitos com amostras de uma parcela (randômica) dos pacientes.

Os resultados com este modelo revelaram que não foram observadas diferenças significativas na magnitude da quebra da barreira epitelial quando as monocamadas de células foram estimuladas com o soro de pacientes com ou sem DECHa GI, coletadas antes ou depois do início do condicionamento. Este resultado exclui a presença de algum modulador humoral com função crítica

sobre a permeabilidade epitelial nestas fases da DECHa GI. Por outro lado, pudemos demonstrar que quando a alteração de permeabilidade induzida pelo soro de pacientes coletado após o condicionamento (entre os dias zero e +10) foi expressa como variação da alteração de permeabilidade induzida pelo soro coletado antes do início do TCTH, apenas nos pacientes que não desenvolveram DECHa pudemos observar a recuperação da função de barreira após 96 horas. Entendemos ser esta uma forma relevante de analisar estes dados, pois expressa a diferença na perturbação da barreira epitelial induzida pelo soro obtido antes do TCTH e o soro obtido no momento que coincide com as fases 1 e 2 da fisiopatologia da DECHa, quando a quebra da permeabilidade epitelial estaria promovendo o maior contato entre antígenos, DAMPs e PAMPs com as células T do doador (11,113). Nos estudos que caracterizaram a presença de quebra de barreira epitelial intestinal em pacientes submetidos a TCTH através do método que mede a absorção de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ a quebra da barreira epitelial estava presente entre os dias +1 e +10 pós infusão, mas a associação desta quebra com a ocorrência de DECHa GI foi mais forte nos pacientes em que a quebra era mais intensa entre os dias +4 e +7 (17,18,125).

5.4. O papel da Zonulina sobre as alterações da JT na DECHa GI

No momento em que este estudo foi desenhado, uma série de publicações do grupo do pesquisador A Fasano postulava que a proteína Zonulina, codificada pelo gene da pré-haptoglobina-2, seria um dos mais importantes reguladores da integridade da barreira epitelial, e mais especificamente das JT(52,53,126–129). Estes dados foram publicados em revistas de grande relevância, e apontavam para a existência de um mediador solúvel da função das JT, cuja disfunção aumentaria a chance do desenvolvimento de doenças autoimunes (130). Chamava atenção em particular a associação com risco para diabetes tipo 1, publicado no periódico *PNAS* em 2005 (em um modelo animal) (126), e no periódico *Diabetes* em 2006, em humanos (131). A literatura era bastante assertiva em colocar a Zonulina como um regulador das JT.

Desde o começo, chamava-nos atenção o fato de uma observação com implicações clínicas tão relevantes ser pouco explorada, com publicações quase

que exclusivamente restritas ao grupo do Dr. Fasano. Ainda assim, entendemos que era interessante avaliar se os níveis de Zonulina no soro poderiam servir como biomarcadores da DECHa. Este era de fato um dos objetivos centrais de nosso estudo original, para o qual foram coletadas amostras em diferentes fases da evolução da doença.

Como mostrado na tese, não conseguimos demonstrar qualquer associação entre os níveis de Zonulina e o risco de DECHa GI. Também não observamos aumento nos níveis de Zonulina no momento do diagnóstico da DECHa GI nos pacientes dos quais dispunhamos amostras desta fase. Estas avaliações foram confirmadas com o kit comercial mais usado nos estudos sobre esta proteína, e recomendado pelo próprio Dr. Fasano em suas publicações e em contato pessoal por email. Além disso, tivemos o cuidado de testar as amostras com outro kit comercial da empresa MyBiosource, e também de avaliar se havia correlação entre os níveis de Zonulina com a haptoglobina total, diante da hipótese de uma reação cruzada dos anticorpos com esta proteína, que possui perfil de proteína de fase aguda. Diante do exposto, concluímos que a liberação de Zonulina para o plasma não é o mecanismo pelo qual o rearranjo das JT, e o aumento da permeabilidade intestinal característicos da DECHa GI ocorre.

No entanto, em Fevereiro de 2018 um grupo alemão publicou um artigo mostrando que o kit utilizado em todo o desenvolvimento da literatura relacionada à Zonulina não possui especificidade para esta proteína, medindo na verdade diversos membros relacionados estruturalmente à Zonulina, mas sem qualquer correlação funcional conhecida (132). Esta parte dos resultados ilustra os desafios da geração de conhecimento científico, mesmo quando todo o rigor científico é adotado.

5.5. O heme como indutor de quebra da barreira epitelial intestinal

Em condições de inflamação acometendo a mucosa intestinal, como por exemplo na DECHa e nas doenças inflamatórias intestinais, bem como em sangramentos relacionados ao uso de drogas como a aspirina (133) a perda dos mecanismos naturais de proteção da mucosa pode levar a aumento na

frequência de sangramentos locais. Neste contexto, é razoável supor que a liberação de hemoglobina livre pode esgotar a haptoglobina, levando à oxidação da hemoglobina, e conseqüentemente, liberação de heme. Embora não haja evidências diretas deste processo, esta possibilidade já foi sugerida por autores que estudam os efeitos deletérios do heme sobre diferentes sistemas (81). Além disso, o heme proveniente da dieta, por não ser completamente absorvido pela mucosa intestinal, também circula pela luz intestinal (134).

Vários estudos sugerem que níveis de heme em excesso podem ser capazes de causar alterações na mucosa do cólon, levando a inflamação e desregulando a proliferação (78), um cenário que já foi associado à conhecida relação epidemiológica entre consumo de carne vermelha e câncer de cólon (83,135). Apesar das evidências da participação do heme na inflamação, os mecanismos moleculares subjacentes a este efeito no TGI ainda são pouco descritos. O único estudo que explorou com mais detalhes o papel do heme na função da barreira epitelial intestinal foi publicado por um grupo brasileiro em 2013 (81). Neste estudo, utilizando uma linhagem de células intestinais epiteliais IEC 6 os autores mostraram que o heme foi capaz promover a produção local de espécies reativas de oxigênio, a expressão de IL-6, a remodelação do citoesqueleto de actina, e um aumento transitório da permeabilidade epitelial nos primeiros 5 a 30 minutos do experimento, utilizando a mensuração manual do TEER.

Nossos dados sobre o efeito do heme sobre a barreira epitelial apontam para a mesma direção, agregando novas informações a este cenário. Utilizando um método mais robusto de avaliação da integridade da barreira epitelial, que mede a TEER em tempo real, pudemos confirmar que o heme nas concentrações de 10 e 50 μM , frequentemente utilizadas em estudos que procuram mimetizar as concentrações observadas em pacientes com doenças em que há aumento do heme livre (61,136), foi capaz de induzir quebra da barreira epitelial intestinal de forma mais estável a partir de 48h, mantida até o final do período de observação de 96h. Cabe destacar que a fim de evitar que o heme livre fosse eliminado do sistema devido a sua ligação com proteínas do soro, nosso protocolo incluiu um re-estímulo com heme a cada 24 horas. Além

disso, com base em evidências de que o heme e o LPS atuam através de vias semelhantes conforme já demonstrado em macrófagos (75), demonstramos que este efeito também ocorre no epitélio intestinal, através da observação de um efeito mais intenso da associação entre heme 10 μ M e LPS 1 μ g/ml do que cada um destes agentes em separado. No caso do heme, as alterações funcionais medidas via TEER foram bem mais evidentes que com o soro de pacientes, e também acompanhadas de alterações estruturais observadas tanto à IF quanto à microscopia em tempo real (time lapse).

As implicações fisiopatológicas deste achado podem incluir não apenas a ativação e perpetuação da inflamações nestas condições em que há sangramento na mucosa, mas também a sepse. Dados recentemente publicados mostram que a sepse é uma condição associada a aumento das concentrações de heme (137). De fato, dados de nosso laboratório recentemente submetidos para publicação confirmam estes achados no choque séptico (Fiusa MML, Costa LNG et al, 2019). Há décadas é reconhecido que a translocação bacteriana decorrente da quebra da barreira epitelial intestinal é um dos mecanismos mais relevantes para a fisiopatologia da sepse, e que envolve diretamente a participação do LPS (138). Embora não seja de nosso conhecimento estudos que tenham medido os níveis de heme livre na luz intestinal em pacientes com sepse grave, estes indivíduos apresentam frequentemente fatores de risco para sangramentos mucosos tais como plaquetopenia, coagulopatia ou infecções comprometendo o TGI. Assim, é possível imaginar que heme e LPS sejam componentes que coexistam na luz intestinal nestes indivíduos, o que torna relevante nossa demonstração de sinergia entre estas duas moléculas na quebra da barreira epitelial intestinal. Novos experimentos explorando as vias através das quais este efeito é mediado, utilizando por exemplo inibidores de TLR4, podem contribuir ainda mais para esta compreensão.

6. CONCLUSÕES

- As alterações histopatológicas observadas em pacientes com DECHa GI em nosso centro são semelhantes às descritas na literatura mundial.
- A associação entre a perda grave de criptas com a gravidade da DECHa GI foi validada em nossa população independente, estando associada à duração da diarreia (em dias) e ao volume de fezes.
- Pacientes com DECHa GI apresentam desarranjo estrutural da região das JT, evidenciado pela redução da proteína ZO-1 da região correspondente a estas estruturas.
- O desarranjo estrutural das JT também foi demonstrado pela microscopia eletrônica, em associação à demonstração da perda de vilosidades nestes pacientes.
- Os níveis circulantes de Zonulina mensurados pelo kit de Elisa comercial mais usado na literatura não se associam à ocorrência da DECHa GI. No entanto, limitações recentemente descritas neste método impedem a exclusão definitiva do papel da Zonulina na fisiopatologia da DECHa GI.
- O soro de pacientes com DECHa GI reduz a capacidade de recuperação da integridade da barreira epitelial de monocamadas de células epiteliais intestinais, quando comparado com o soro de pacientes que não apresentam a DECHa GI. Esta alteração só é observada com o soro coletado no período pós condicionamento.
- O soro de pacientes com DECHa GI no período pós-condicionamento produz alteração na imunolocalização de ZO-1 em linhagens de células epiteliais intestinais, não observada com o soro de pacientes sem DECHa GI.
- O heme na concentração de 10 e 50 μM foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade de monocamadas de células epiteliais intestinais, associado a alteração na imunolocalização de ZO-1.
- A associação do heme com o LPS potencializa o efeito de quebra da barreira epitelial destas duas moléculas isoladamente.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kambham N, Higgins JP, Sundram U, Troxell ML. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Adv Anat Pathol*. 2014 Sep;21(5):301–20.
2. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Apr 2;50(4):476–82.
3. Jaglowski SM, Devine SM. Graft-versus-host disease: why have we not made more progress? *Curr Opin Hematol*. 2014 Mar;21(2):141–7.
4. Hahn T, McCarthy PL, Hassebroek A, Bredeson C, Gajewski JL, Hale GA, et al. Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 1;31(19):2437–49.
5. Harris AC, Ferrara JLM, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol*. 2013 Feb;160(3):288–302.
6. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):385–9.
7. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007 Jan 21;25:139–70.
8. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(1):30–45.
9. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1550–61.
10. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4–10.
11. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. 2017;377(22):2167–79.
12. TERASAKI PI. Identification of the type of blood-cell responsible for the graft-versus-host reaction in chicks. *J Embryol Exp Morphol*. 1959 Sep;7:394–408.
13. Kopolovic I, Ostro J, Tsubota H, Lin Y, Cserti-Gazdewich CM, Messner HA, et al. A systematic review of transfusion-associated graft-versus-host disease. 2015;
14. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease

- biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun;12(6):443–58.
15. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res*. 2007 Oct;150(4):197–214.
 16. Penack O, Holler E, van den Brink MRM. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):1865–72.
 17. Johansson J-E, Ekman T. Gastro-intestinal toxicity related to bone marrow transplantation: disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. Vol. 19, *Bone Marrow Transplantation*. 1997.
 18. Johansson J-E, Brune M, Ekman T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Oct 22;28(8):737–42.
 19. Johansson J-E, Ekman T. Gut Toxicity During Hemopoietic Stem Cell Transplantation May Predict Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in Patients. *Dig Dis Sci*. 2007 Aug 7;52(9):2340–5.
 20. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*. 2001 Mar;29(3):259–77.
 21. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006 Jul;108(1):390–9.
 22. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):11–6.
 23. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Aug;1(2):a002584–a002584.
 24. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Nov;9(11):799–809.
 25. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008 Apr;180(8):5653–61.
 26. Turner JR, Angle JM, Black ED, Joyal JL, Sacks DB, Madara JL. PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 1):C554-62.
 27. Turner JR, Buschmann MM, Romero-Calvo I, Sailer A, Shen L. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Dec;36:204–12.
 28. Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1378-85.

29. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol.* 2005 Feb;166(2):409–19.
30. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Dec;36:157–65.
31. Denker BM, Saha C, Khawaja S, Nigam SK. Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. *J Biol Chem.* 1996 Oct;271(42):25750–3.
32. Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci.* 2002 Sep;115(Pt 18):3565–73.
33. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, et al. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol.* 2001 Mar;152(6):1183–96.
34. Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, et al. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in Occludin Prevents Its Interaction with ZO-1 and Destabilizes Its Assembly at the Tight Junctions. *J Biol Chem.* 2009 Jan;284(3):1559–69.
35. Rao R. Occludin Phosphorylation in Regulation of Epithelial Tight Junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165(1):62–8.
36. Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, et al. PKC regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Jan;106(1):61–6.
37. Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Dokladny K, Alhmoud T, Ereifej L, et al. Mechanism of IL-1 Modulation of Intestinal Epithelial Barrier Involves p38 Kinase and Activating Transcription Factor-2 Activation. *J Immunol.* 2013 Jun;190(12):6596–606.
38. Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, et al. Interleukin-6 Modulation of Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Is Mediated by JNK Pathway Activation of Claudin-2 Gene. Anant S, editor. *PLoS One.* 2014 Mar;9(3):e85345.
39. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol.* 2013 Feb;182(2):375–87.
40. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Sep;11(9):1075–83.
41. Shen L, Turner JR. Role of Epithelial Cells in Initiation and Propagation of Intestinal Inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2006 Apr;290(4):G577–82.

42. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2.
43. Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest.* 1989 Feb;83(2):724-7.
44. Taylor CT, Dzus AL, Colgan SP. Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology.* 1998 Apr;114(4):657-68.
45. Mullin JM, Laughlin K V., Marano CW, Russo LM, Soler AP. Modulation of tumor necrosis factor-induced increase in renal (LLC-PK1) transepithelial permeability. *Am J Physiol Physiol.* 1992 Nov;263(5):F915-24.
46. Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res.* 2007 Dec;8(1):75.
47. Baker OJ, Camden JM, Redman RS, Jones JE, Seye CI, Erb L, et al. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am J Physiol Physiol.* 2008 Nov;295(5):C1191-201.
48. Tiruppathi C, Naqvi T, Sandoval R, Mehta D, Malik AB. Synergistic effects of tumor necrosis factor- α and thrombin in increasing endothelial permeability. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2001 Oct;281(4):L958-68.
49. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology.* 1999 Jan;116(1):22-8.
50. Tamion F, Richard V, Lyoumi S, Daveau M, Bonmarchand G, Leroy J, et al. Gut ischemia and mesenteric synthesis of inflammatory cytokines after hemorrhagic or endotoxic shock. *Am J Physiol Liver Physiol.* 1997 Aug;273(2):G314-21.
51. Brown GR, Lindberg G, Meddings J, Silva M, Beutler B, Thiele D. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease. *Gastroenterology.* 1999 Mar;116(3):593-601.
52. Fasano A, Fiorentini C, Donelli G, Uzzau S, Kaper JB, Margaretten K, et al. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):710-20.
53. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 29;106(39):16799-804.
54. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1258(1):25-33.
55. Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic

- and therapeutic implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;10(10):1096–100.
56. Fegan C, Poynton CH WJ. The gut mucosal barrier in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 1990;5(6):373–7.
 57. Noth R, Lange-Grumfeld J, Stüber E, Kruse M-L, Ellrichmann M, Häsler R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model. *BMC Gastroenterol*. 2011 Dec 6;11(1):109.
 58. Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*. 2009 Jan;58(1):41–8.
 59. Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2012;3:77.
 60. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014 May 27;5:115.
 61. Soares MP, Bozza MT. Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr Opin Immunol*. 2016 Feb;38:94–100.
 62. Ekregbesi P, Shankar-Hari M, Bottomley C, Riley EM, Mooney JP. Relationship between Anaemia, Haemolysis, Inflammation and Haem Oxygenase-1 at Admission with Sepsis: a pilot study. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):11198.
 63. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 2005 Jul 4;157(3):175–88.
 64. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013 Feb 21;121(8):1276–84.
 65. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Oct;61(2):748–55.
 66. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*. 1986 Jan 5;261(1):411–9.
 67. Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J Biol Chem*. 1986 Aug 25;261(24):11131–7.
 68. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010 Feb;50(1):323–54.
 69. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free

- heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med*. 2008 Oct 19;86(10):1097–111.
70. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007 Jun 13;13(6):703–10.
 71. Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):237–41.
 72. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol*. 2014 Jan;5:61.
 73. Brandtzaeg P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scand J Immunol*. 2009 Dec;70(6):505–15.
 74. Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, Rawat M, Nighot P, Watterson MD, et al. EPITHELIAL AND MESENCHYMAL CELL BIOLOGY
Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Express. 2017;
 75. Fernandez PL, Dutra FF, Alves L, Figueiredo RT, Mourão-Sa D, Fortes GB, et al. Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation. *J Biol Chem*. 2010 Oct;285(43):32844–51.
 76. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226(1):172–90.
 77. Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2007 Sep;622(1–2):42–57.
 78. Oates P-S, West A-R. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 21;12(27):4281–95.
 79. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb;235(4792):1043–6.
 80. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(1):129–35.
 81. Barcellos-De-Souza P, Moraes JA, Madureira De-Freitas-Junior JC, Andrés Morgado-Díaz J, Barja-Fidalgo C, Arruda MA. Heme modulates intestinal epithelial cell activation: involvement of NADPHox-derived ROS signaling. *J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:170–9.
 82. Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and

- colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.* 1999 Nov;59(22):5704–9.
83. Pierre F, Taché S, Petit CR, Van der Meer R, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis.* 2003 Jul;24(10):1683–90.
 84. Pierre F, Freeman A, Taché S, Van der Meer R, Corpet DE. Beef Meat and Blood Sausage Promote the Formation of Azoxymethane-Induced Mucin-Depleted Foci and Aberrant Crypt Foci in Rat Colons. *J Nutr.* 2004 Oct;134(10):2711–6.
 85. Glei M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K, Pool-Zobel BL. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2006 Feb;594(1–2):162–71.
 86. Park H-Y, Kunitake Y, Hirasaki N, Tanaka M, Matsui T. Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015 Jan 2;79(1):130–7.
 87. Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2005 Mar;288(3):G422–30.
 88. Ranaldi G, Consalvo R, Sambuy Y, Scarino ML. Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. *Toxicol Vitro.* 2003 Oct;17(5–6):761–7.
 89. Briceño MP, Nascimento LAC, Nogueira NP, Barenco PVC, Ferro EAV, Rezende-Oliveira K, et al. *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. *J Histochem Cytochem.* 2016;64(8):459–69.
 90. Chen S, Einspanier R, Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem Cell Biol.* 2015 Nov;144(5):509–15.
 91. Alhamoruni A, Lee AC, Wright KL, Larvin M, O’Sullivan SE. Pharmacological Effects of Cannabinoids on the Caco-2 Cell Culture Model of Intestinal Permeability. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct 1;335(1):92–102.
 92. Bein A, Zilbershtein A, Golosovsky M, Davidov D, Schwartz B. LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *J Cell Physiol.* 2017 Feb 1;232(2):381–90.
 93. Rutten MJ, Laraway B, Gregory CR, Xie H, Renken C, Keese C, et al. Rapid assay of stem cell functionality and potency using electric cell-substrate impedance sensing. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec;6(1):192.

94. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295–304.
95. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keshavarzian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol*. 2007 Oct;82(10):881–6.
96. Wang F, Schwarz BT, Graham WV, Wang Y, Su L, Clayburgh DR, et al. IFN- γ -Induced TNFR2 Expression Is Required for TNF-Dependent Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *Gastroenterology*. 2006 Oct 1;131(4):1153–63.
97. Schulenburg A, Turetschek K, Wrba F, Vogelsang H, Greinix HT, Keil F, et al. Early and late gastrointestinal complications after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2004 Feb 1;83(2):101–6.
98. Wong NACS. Gastrointestinal pathology in transplant patients. *Histopathology*. 2015 Mar;66(4):467–79.
99. Snover DC. Mucosal damage simulating acute graft-versus-host reaction in cytomegalovirus colitis. *Transplantation*. 1985 Jun;39(6):669–70.
100. Lin J, Fan R, Zhao Z, Cummings OW, Chen S. Is the Presence of 6 or Fewer Crypt Apoptotic Bodies Sufficient for Diagnosis of Graft Versus Host Disease? A Decade of Experience at a Single Institution. *Am J Surg Pathol*. 2013 Apr;37(4):539–47.
101. Nguyen C V., Kastenber DM, Choudhary C, Katz LC, DiMarino A, Palazzo JP. Is Single-Cell Apoptosis Sufficient for the Diagnosis of Graft-Versus-Host Disease in the Colon? *Dig Dis Sci*. 2008 Mar 1;53(3):747–56.
102. Gastroenterology B, Shidham VB, Chang C-C, Shidham G, Ghazala F, Lindholm PF, et al. Colon biopsies for evaluation of acute graft-versus-host disease (A-GVHD) in allogeneic bone marrow transplant patients.
103. Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, Hingorani S, Horn T, Huber E, et al. NIH Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Apr;21(4):589–603.
104. Socié G, Mary J-Y, Lemann M, Daneshpouy M, Guardiola P, Meignin V, et al. Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):50–7.
105. Levine JE, Huber E, Hammer STG, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, et al. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1505–9.
106. Binder HJ. Mechanisms of diarrhea in inflammatory bowel diseases. *Ann*

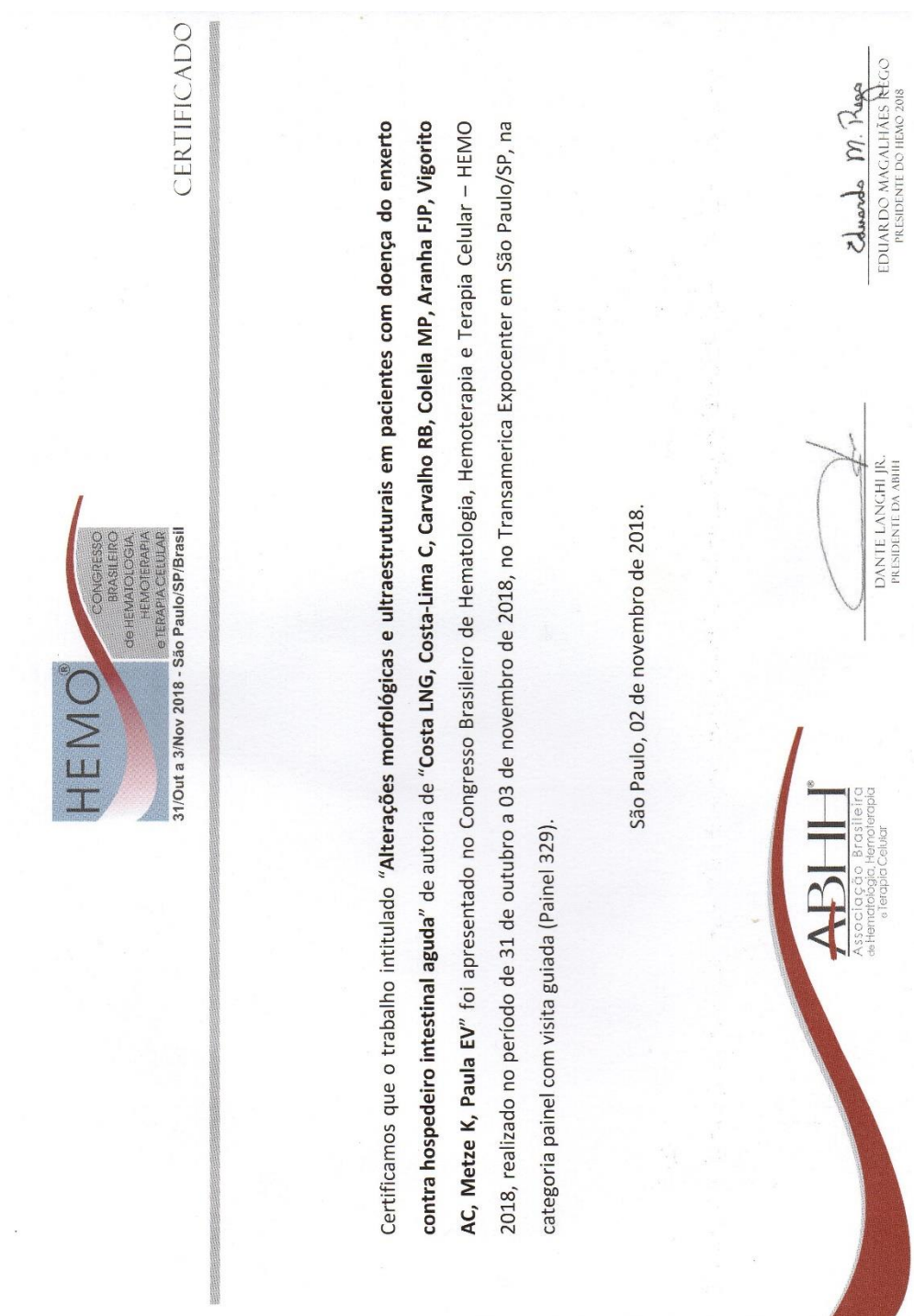
- N Y Acad Sci. 2009 May;1165:285–93.
107. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst.* 1974 Feb;52(2):401–4.
 108. Weisdorf SA, Salati LM, Longsdorf JA, Ramsay NK, Sharp HL. Graft-versus-host disease of the intestine: a protein losing enteropathy characterized by fecal alpha 1-antitrypsin. *Gastroenterology.* 1983 Nov;85(5):1076–81.
 109. Rezvani AR, Storer BE, Storb RF, Mielcarek M, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Decreased Serum Albumin as a Biomarker for Severe Acute Graft-versus-Host Disease after Reduced-Intensity Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Nov;17(11):1594–601.
 110. Zeiser R, Socié G, Blazar BR. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation. *Br J Haematol.* 2016 Oct;175(2):191–207.
 111. Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer.* 2018 May;18(5):283–95.
 112. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 May 11;
 113. Koyama M, Hill GR. Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: fuel for the fire. *Blood.* 2016 Jun 16;127(24):2963–70.
 114. Peled JU, Hanash AM, Jenq RR. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2016 Dec 2;2016(1):119–27.
 115. van Bekkum DW, Knaan S. Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Mar;58(3):787–90.
 116. Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, et al. Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Infect Dis.* 2017 Nov;65(12):1984–91.
 117. Swimm A, Giver CR, DeFilipp Z, Rangaraju S, Sharma A, Ulezko Antonova A, et al. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood.* 2018 Dec;132(23):2506–19.
 118. Qi X, Li X, Zhao Y, Wu X, Chen F, Ma X, et al. Treating Steroid Refractory Intestinal Acute Graft-vs.-Host Disease With Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study. *Front Immunol.* 2018 Sep;9:2195.
 119. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN, Verne

- GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2012 Jun;24(6):503–12.
120. Ma Y, Semba S, Khan MRI, Bochimoto H, Watanabe T, Fujiya M, et al. Focal adhesion kinase regulates intestinal epithelial barrier function via redistribution of tight junction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013 Jan;1832(1):151–9.
 121. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *J Nutr.* 2011 May;141(5):769–76.
 122. Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 Stabilizes the Tight Junction Solute Barrier through Coupling to the Perijunctional Cytoskeleton. Mostov K, editor. *Mol Biol Cell.* 2009 Sep;20(17):3930–40.
 123. Tash BR, Bewley MC, Russo M, Keil JM, Griffin KA, Sundstrom JM, et al. The occludin and ZO-1 complex, defined by small angle X-ray scattering and NMR, has implications for modulating tight junction permeability. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Jul;109(27):10855–60.
 124. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2011 Dec;118(25):6702–8.
 125. Johansson J-E, Ekman T. Gut Toxicity During Hemopoietic Stem Cell Transplantation May Predict Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in Patients. *Dig Dis Sci.* 2007 Aug 7;52(9):2340–5.
 126. Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type 1 diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb;102(8):2916–21.
 127. Fasano A. Intestinal zonulin: open sesame! *Gut.* 2001 Aug;49(2):159–62.
 128. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4435–40.
 129. Di Pierro M, Lu R, Uzzau S, Wang W, Margaretten K, Pazzani C, et al. Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem.* 2001 Jun;276(22):19160–5.
 130. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue barriers.* 2016 Oct;4(4):e1251384.
 131. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* 2006 May;55(5):1443–9.
 132. Scheffler L, Crane A, Heyne H, Tönjes A, Schleinitz D, Ihling CH, et al. Widely Used Commercial ELISA Does Not Detect Precursor of

- Haptoglobin2, but Recognizes Properdin as a Potential Second Member of the Zonulin Family. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Feb;9:22.
133. Lynch NM, McHutchison JG, Young GP, Deacon M, St John DJ, Barraclough D. Gastrointestinal blood loss from a new buffered aspirin (Ostoprin): measurement by radiochromium and Hemoquant techniques. *Aust N Z J Med*. 1989 Apr;19(2):89–96.
 134. Young GP, Rose IS, St John DJ. Haem in the gut. I. Fate of haemoproteins and the absorption of haem. *J Gastroenterol Hepatol*. 1989;4(6):537–45.
 135. Sasso A, Latella G. Role of Heme Iron in the Association Between Red Meat Consumption and Colorectal Cancer. *Nutr Cancer*. 2019 Jan;1–11.
 136. Ghosh S, Adisa OA, Chappa P, Tan F, Jackson KA, Archer DR, et al. Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest*. 2013 Nov 1;123(11):4809–20.
 137. Ekregbesi P, Shankar-Hari M, Bottomley C, Riley EM, Mooney JP. Relationship between Anaemia, Haemolysis, Inflammation and Haem Oxygenase-1 at Admission with Sepsis: a pilot study. *Sci Rep*. 2018 Jul;8(1):11198.
 138. Schlag G, Redl H, Hallström S. The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation*. 1991 Apr;21(2–3):137–80.


8. APÊNDICES


Apêndice 1 - Apresentação do trabalho em forma de pôster no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, a ser realizado em São Paulo em 31 de outubro de 2018.



Apêndice 2 – Apresentação do trabalho na modalidade oral no Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial, a ser realizado em Teresina-PI em 02 de dezembro de 2017. Menção Honrosa como melhor trabalho apresentado na modalidade oral.

MENÇÃO HONROSA






30 de Nov e
01 e 02 de Dez 2017
10h às 20h
Atlantic City - Teresina-PI


Certificamos a Loredana Nilkenes Gomes da Costa que apresentou o trabalho científico “Associação Entre Alterações Histopatológicas e Gravidade Clínica na Doença do Exerto Contra o Hospedeiro Aguda Intestinal” na modalidade oral, o título de menção honrosa do VI Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial – VI MEDLAB que aconteceu dia 02 de dezembro de 2017 no centro de convenções Atlantic City, Teresina, Piauí.

Diretor Gpi Cursos
Stanley Jone Nogueira Candeira




Presidente VI Medlab
Dra. Symbonara Faustino


Apoio



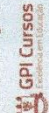

Patrocínio



Patrocínio Master



Realização

Teresina, PI, 02 de dezembro de 2017.

Association between histopathological alterations and diarrhea severity in acute intestinal graft-versus-host disease

Loredana Nilkenes Gomes da Costa, MSc^{a,c,*}, Carolina Costa-Lima, MD, MSc^{a,b},
Luciana Rodrigues de Meirelles, MD, PhD^a, Rita B. Carvalho, MD^a, Marcos Paulo Colella, MD^b,
Francisco Jose Penteado Aranha, MD^b, Afonso Celso Vigorito, MD^b, Erich Vinicius De Paula, MD, PhD^{a,b}

Abstract

Gastrointestinal (GI) acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains one of the most important complications of allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). The diagnosis of this complication is largely dependent on clinical symptoms, but GI biopsies are warranted in most cases, due to the multitude of potential causes that coexist in patients with a clinical suspicion of this complication. In addition, several lines of evidence support that the GI is not only a target organ in aGVHD, but also a key mediator of the pathogenesis of this condition. Controversy exists on whether histopathological findings are associated with clinical severity. Crypt loss is a relatively straightforward histological finding of GI aGVHD, whose presence has been associated with disease severity in a previous study.

In order to independently validate this association, we retrospectively evaluated all histological changes from 25 patients with confirmed GI aGVHD who underwent allo-HCT in our center from 2008 to 2014. Clinical, laboratory, and histological data were obtained from the medical records and pathological reports. All GI biopsies were reviewed by 2 investigators blinded to clinical data, who classified GI aGVHD according to the presence of severe crypt loss.

The proportion of patients with grades I–II and III–IV aGVHD patients in our population were 45.5% and 54.5%, respectively. The most common histological alterations were isolated apoptotic bodies, present in 80% of colon biopsies with aGVHD. Severe crypt loss, corresponding to grades III–IV aGVHD was associated with higher stool volumes ($P = .02$) and increased diarrhea duration ($P = .02$), but not with response to steroids or mortality.

In this study, we independently validated that the presence of severe crypt loss, a reliable and simple parameter to grade the extension of GI aGVHD, is associated with disease severity in GI aGVHD.

Abbreviations: aGVHD = acute graft-versus-host disease, allo-HCT = allogeneic hematopoietic cell transplantation, allo-HSCT = allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, CLN = colonoscopy, CMV = cytomegalovirus, GI = gastrointestinal, GVHD = graft-versus-host disease, HD = high dose, HLA = human leukocyte antigens, LD = low dose, MMF = micophenolate mofetil, TRM = transplant-related mortality, UGE = upper gastrointestinal endoscopy.

Keywords: crypt loss, graft versus host disease, histopathological, intestinal

1. Introduction

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) is one of the main complications of allogeneic hematopoietic cell transplantation

(allo-HCT) which, despite improvements in conditioning and supportive care, remains lethal for a large proportion of patients.^[1,2] The diagnosis and grading of aGVHD is based on classical criteria that considers signs and symptoms affecting the skin, liver, and gastrointestinal (GI) tract.^[3–5] Severity of aGVHD according to these criteria is associated with important outcomes, and patients with grades III–IV aGVHD present a significantly higher mortality.^[6] In the GI tract, aGVHD manifests predominantly as an intense diarrhea that can evolve to bleeding, severe abdominal pain, and ileus.^[2]

In the last decade, several lines of evidence indicated that the GI tract presents a prominent role in aGVHD, not only as a major target organ, but also as a mediator of the pathogenesis of this condition. Severity of aGVHD has also been associated with the integrity of the epithelial barrier in a study with 38 allo-HCT recipients, suggesting that barrier breakdown in the early phases of aGVHD could facilitate T-cell mediated response that characterizes this condition.^[7] In addition, intestinal cells were identified as key mediators of the pathogenesis of aGVHD,^[8] and characteristics of the microbiota were associated with aGVHD severity and mortality.^[9] Finally, some of the most promising and important biomarkers of aGVHD identified in the last years have their function directly or indirectly associated with the GI tract.^[10–12]

Editor: ZhiJun Duan.

This study was financially supported by Fapesp (grant 2013/09319-0) and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue CNPq / MCT / FAPESP).

The authors declare that they have no competing interests.

^a Faculty of Medical Sciences, ^b Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, ^c Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil.

* Correspondence: Loredana Nilkenes Gomes da Costa, Federal University of Piauí, Av. São Sebastião, 2819, Parnaíba, PI, 64202-020, Brazil (e-mail: loredananilkenes@gmail.com).

Copyright © 2018 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Medicine (2018) 97:19(e0600)

Received: 5 September 2017 / Accepted: 8 April 2018

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000010600>

Although the diagnosis of GI aGVHD relies mostly on clinical symptoms, GI biopsies are important due to the multitude of alternative causes for diarrhea in those patients. However, controversy exists on the precise association between histopathological findings and clinical severity.^[7] In particular, the presence of crypt loss has been previously associated with aGVHD disease,^[13] but this observation has not been independently validated. Here, we retrospectively evaluated the histological findings in a consecutive cohort of patients who underwent allo-HCT, in whom a clinical suspicion of aGVHD resulted in the performance of GI biopsies.

2. Methods

This was a retrospective single-center observational study that analyzed clinical and histopathology data from patients who received an allo-HCT between April 2007 and February 2014 at University of Campinas, Brazil. All consecutive patients with a clinical suspicion of GI aGVHD submitted to upper gastrointestinal endoscopy (UGE) or colonoscopy (CLN) in the post-HCT period, for whom GI biopsies were available, were eligible for the study. Patients were identified from the electronic database of GI biopsies from our institution, through a search using the expression, "GVHD" in the test request. Demographic and clinical data were obtained from the records of the HCT Unit and from the electronic laboratory database.

The study was approved by the local Institutional Review Board and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.1. Transplantation procedure and definitions

Conditioning regimens were classified as high (HD) or low dose (LD) based on previously published criteria.^[14] Pharmacologic GVHD prophylaxis consisted of at least 2 agents, including a calcineurin inhibitor. No donor grafts were depleted of T cells, and all procedures were performed from human leukocyte antigens (HLA) matched related donors. aGVHD was diagnosed and graded according to classical criteria.^[3-5] Data from the frequency of bowel movements and stool volume were obtained from the medical and nurse records of the HCT unit.

2.2. Evaluation of histological findings

Initially, histological findings of biopsies were obtained from the original pathology reports. Our institutional protocol recommends that in the evaluation of patients with suspected GI aGVHD, at least 1 biopsy sample is obtained from each colon portion ascending, transverse, and sigmoid, as well as from other areas with macroscopic alterations, unless limited by technical issues. All specimens were stained with hematoxylin and eosin. In these reports, histological findings described as compatible with GI aGVHD included: presence of apoptotic bodies, crypt abscesses, crypt loss of individual or contiguous crypts, or total mucosa denudation or ulceration. Although these alterations are used in the classical grading system used to classify the histological findings of aGVHD,^[15-17] grading was not included in all original reports. Therefore, all cases were reviewed by 2 investigators (LNGC and RBC) that were blinded to the clinical outcome. In this review, the histological findings were graded using a modification of the grading system described by Lerner et al^[18]: grade I—isolated apoptotic bodies with not crypt loss; grade II—isolated crypt loss; grade III—loss of ≥ 2 contiguous

crypts; grade IV—extensive crypt loss with mucosal denudation. According to the definition used in the study that associated crypt loss with poorer outcomes, severe crypt loss was defined as grades III or IV GVHD.^[13]

2.3. Statistical analyses

Results are expressed as means, medians, standard deviation, and ranges. Categorical and continuous variables are compared using the Fisher exact or Mann-Whitney *U* test, respectively. GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, Inc., California) was used to analyze and present the data.

3. Results

During the study period, a total of 203 patients were submitted to allo-HCT in our Center. GI biopsies due to a clinical suspicion of aGVHD were performed in 25 patients, which were included in this retrospective analysis. The clinical and demographic characteristics of these patients are presented in Table 1. All but one of these patients included in this analysis presented aGVHD clinical grades III or IV according to the Glucksberg clinical classification. Median time to the confirmation of GI aGVHD diagnosis was 75.5 days (28–162). Treatment regimens are shown in Table 2. Six patients (24%) presented steroid-refractory aGVHD. One-year transplant-related mortality (TRM) was 40% among all grades III–IV aGVHD patients. All 6 steroid-refractory patients died within the 1st year after HCT.

Biopsies were compatible with the clinical suspicion of aGVHD in 22/25 (88%) patients. In total, specimens were available from duodenum (n=15 patients), ileum (n=10 patients), and colon (n=21 patients). The distribution of biopsies and the presence of findings associated with GI aGVHD per site are shown in Table 3. Histological findings associated with GI aGVHD in our study population are shown in Table 4. The proportion of histological grades I–II and III–IV GI aGVHD were

Table 1
Demographic and clinical parameters of the study population.

Characteristics	n = 25
Patient age, median (range), y	49 (17–68)
Patient gender, no. male/female	19/6
Diagnosis at HCT, n	
Acute leukemia	7
Chronic myeloid leukemia/myelofibrosis	2
Lymphomas	5
Chronic lymphocytic leukemia	3
Multiple myeloma	4
Myelodysplastic syndrome	1
Severe aplastic anemia/PNH	2
Sickle cell disease	1
Donor-female/male-recipient, n (%)	13 (52%)
Conditioning regimen, n	
High dose	10
Low dose	15
Graft source, n	
Bone marrow	4
Mobilized blood	21
Clinical of diagnosis acute GVHD, n	
Grades I–II	1
Grades III–IV	24

GVHD = graft-versus-host-disease, HCT = hematopoietic cell transplantation, PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Table 2
Clinical characteristics of patients with biopsies compatible with aGVHD.

Clinical characteristics of GI aGVHD	n=22
GI aGVHD stage*	
0-1	3
2-3	11
4	6
GI aGVHD diagnosis day, median (range)	74 (28-162)
Peak daily stool volume, mL, median (range)	2800 (0-8650)
Duration of diarrhea, days, median (range)	26 (0-124)
Treatment regimen, n (%)	
Steroids**	16 (73%)
Other***	6 (23%)

GI aGVHD = gastrointestinal acute graft-versus-host-disease.

* According to Glucksberg et al.¹⁴ Data not available for 2 patients.

** Anti-thymocyte globulin (n=2), micophenolate mofetil (n=1), Alemtuzumab (n=2), Basiliximab (n=1).

10/22 (45.5%) and 12/22 (54.5%), respectively. Clinical and demographic differences between these groups are shown in Table 5. Patients with histological grade III-IV GI aGVHD presented higher stool volume and diarrhea length (Fig. 1). No differences were observed in the frequency of steroid-refractory aGVHD and TRM.

4. Discussion

Acute GVHD still represents a leading cause of non-relapse mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), and a major restriction for allo-HSCT success.¹¹⁹ Therefore, identification and validation of aGVHD biomarkers is very important for the management of this condition. The main finding of our study was that a specific characteristic of GI biopsies, namely the presence of severe crypt loss, can provide information on clinical relevance in aGVHD.

The characterization of aGVHD-specific alterations in GI biopsies of patients submitted to allo-HCT is challenging due to the coexistence of several conditions that can result in GI pathology. The spectrum of these alterations includes treatment-related mucositis, which is more frequent in the first 2 to 3 weeks after HCT, infections, and immunosuppressive-associated colitis. Since aGVHD usually manifests after the 3rd week of HCT, the differential diagnosis with chemotherapy-induced mucositis is less complex. On the other hand, cytomegalovirus (CMV) infection is a very prevalent complication of allo-HCT, whose time of presentation overlaps with that aGVHD. In one series, CMV infection always presented within 100 days of transplantation,¹¹⁹ which is the very period when aGVHD is more prevalent. The limitations of the histological assessment of these cases are illustrated by study that demonstrate that CMV infection alone is regarded as sufficient to cause apoptosis

Table 3
Distribution of biopsies per site.

Biopsy site	Patients (n)	Presence of GI aGVHD, n (%)
Duodenum	15	15 (100%)
Ileum	10	10 (100%)
Colon*	21	19 (90%)

GI aGVHD = gastrointestinal acute graft-versus-host-disease.

* Of the 21 patients for whom colon biopsies were available, 19 had samples from both ascending, transverse and rectosigmoid portions. The remaining 2 patients had samples only from recto sigmoid.

Table 4
Histopathological alterations observed in GI biopsies compatible with GI aGVHD. (n=22 patients).

Alterations	Duodenum (n=15)	Ileum (n=10)	Colon (n=19)
Isolated apoptotic bodies	12/15 (80%)	4/10 (40%)	16/19 (84%)
Isolated crypt loss	0	0	2/19 (11%)
Contiguous crypt loss	4/15 (27%)	2/10 (20%)	4/19 (21%)
Mucosal denudation	3/15 (20%)	2/10 (20%)	6/19 (32%)
CMV-associated changes	3/15 (20%)	2/10 (20%)	3/19 (16%)
Histological grade III/IV	7/15 (47%)	4/10 (40%)	10/19 (53%)

CMV = cytomegalovirus, GI aGVHD = gastrointestinal acute graft-versus-host-disease.

of intestinal epithelial cells,^{116,201} as well as by the recent demonstration that CMV infection can be identified by molecular biology techniques in samples lacking typical viral inclusions, or even CMV immunopositivity.^{121,231} In our cohort, concomitant CMV infection was diagnosed in 11/22 (50%) of patients based on antigenemia and polymerase chain reaction (PCR). Among these patients, histological finding suggesting CMV infection were reported in 7/11 patients. Since additional techniques capable to refine the differential diagnosis of these conditions such as immunohistochemistry or PCR were not performed, we are not able to discuss the impact of CMV infection in our results. Micophenolate mofetil (MMF) was not frequently used in our patients, and we do not expect MMF-associated colitis to be a relevant confounder in our study.

Epithelial cell apoptosis is the hallmark histological feature of GI aGVHD, especially when observed in the deeper (proliferative) areas of intestinal crypts.¹¹⁶ The system used to grade histological changes in GI GVHD is based on the presence of epithelial cell apoptosis and crypt loss.¹¹⁶ Controversy exists on the number of apoptotic cells that should be identified to support the diagnosis of GI GVHD, and in other minimal criteria to support this diagnosis. Nguyen et al.¹²² retrospectively evaluated 85 biopsies of patients with GI aGVHD and concluded that a single apoptotic body is sufficient to support the diagnosis of this condition, in patients with associated skin GVHD. In contrast, Lin et al.¹²³ demonstrated that the presence of 6 or fewer apoptotic bodies per 10 contiguous crypts were not sufficient to support the diagnosis of GI aGVHD, although an alert to clinicians about this possibility was recommended by the authors. Recent studies that tried to estimate the relative accuracy of

Table 5
Clinical outcomes according to the presence of crypt loss.

	No severe crypt loss** (n=10)	Severe crypt loss*** (n=12)	P****
Stool volume per day, peak, mL	1800 (0-4710)	3224 (1792-8650)	.03
Duration of diarrhea, d	16 (0-124)	24.5 (10-80)	.02
Day of aGVHD diagnosis, d	94.5 (47-162)	49 (38.5-108.5)	0.18
Steroid response, Yes/No	1/9	5/7	0.17
TRM (1 y), Yes/No***	3/6	7/4	0.37

GI aGVHD = gastrointestinal acute graft-versus-host-disease, TRM = transplant-related mortality.

** Corresponding to histological grades I and II GI GVHD.

*** Corresponding to grades III and IV GI GVHD.

**** Deaths due to progressive disease (n=2) excluded from the analysis.

**** P value from Mann-Whitney U of Fisher exact tests. Continuous data presented as median and range.

Bold values signify to highlight the statistically significant P value.

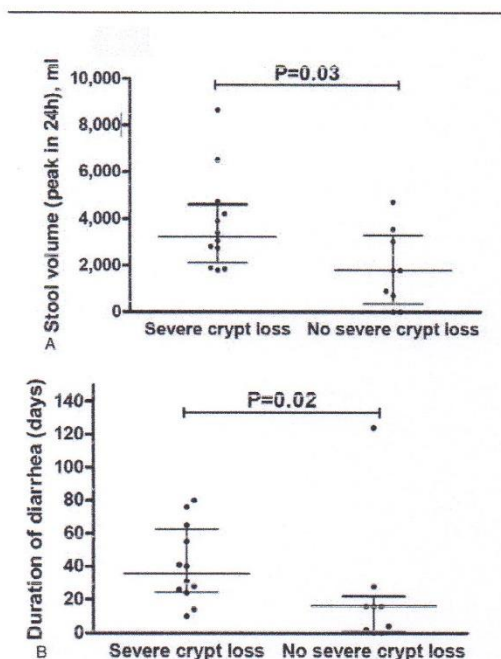


Figure 1. Clinical characteristics of GI aGVHD. Dot plots for the peak stool volume (mL) in 1 day (A) and for the duration of diarrhea in days (B) for patients with and without severe crypt loss. Mann-Whitney *U* test. aGVHD=acute graft-versus-host disease, GI=gastrointestinal.

several alterations observed in these patients, identified intra-cryptal apoptosis as the most reliable indicator of GI aGVHD, in particular when associated with other alterations that were more often present in patient with GI GVHD than in patients with non-GVHD related GI symptoms.^[24] These additional alterations that were more often associated with GI aGVHD were pericryptal apoptosis, dilated crypts, irregular distribution of crypts, decreased lymphocytes, increased micro vessel network, focal fibrosis, presence of muciphages, mucosal ulceration, and/or reduced mucosal thickness. The updated NIH Consensus document on the pathological diagnosis of GI GVHD acknowledges this lack of definition, and questions the benefits of grading GI GVHD.^[25] In our sample, apoptotic bodies were present in 80%, 40%, and 20% of patients in duodenum, ileum, and colon, respectively, and were key to the diagnosis of GI GVHD.

Controversy also exists on the association between histological findings with clinical severity, with limited demonstrations of the presence of such associations. In 2004, in a retrospective study with 95 patients who underwent gastroduodenal biopsy, Socie^[26] demonstrated that the presence of ≥ 5 apoptotic bodies per field, or ≥ 20 neutrophils within the cellular infiltrate was associated with TRM. More recently, Paneth cell loss, counted in H&E stained sections, in at least 3 (40 \times) high power fields in the area with most Paneth cells, was also identified as a poor prognosis marker in GI GVHD.^[11]

One frequent and relatively straightforward histological alteration in GI aGVHD is the presence of severe crypt loss.

In 2007, Melson et al^[13] also demonstrated that the presence of this alteration, which corresponds to grades III–IV histological changes, was associated with steroid-refractory aGVHD and mortality in a cohort of 23 patients who underwent colonoscopy. To our knowledge, this study was not validated in an independent population, and this was one of the main aims of our study. In our patients, histological alterations were not different than those commonly reported in other studies of GI aGVHD. Using a well-characterized cohort of patients we were able to show that severe crypt loss is associated with higher stool volume and increased diarrhea duration, which are clinical characteristics suggestive of increased severity. Although we did not find an association with response to steroids and mortality, our sample size was not powered to exclude such association.

Our study presents several limitations that need to be acknowledged by the reader. First, it included a low number of patients and used a retrospective design. GI aGVHD is a relatively infrequent condition, and most single center studies that addressed the association between clinical and histological parameters also used a retrospective design and enrolled <100 patients. On the other hand, the fact that our population consisted of a cohort of consecutive patients submitted to allo-HCT under standardized conditions (i.e., same staff, within a relatively short-time span), could be regarded as a strength of our study. A second limitation is one inherent to retrospective studies and refers to the fact that a standardized sample collection protocol was not used, and that endoscopies and pathology analyses were performed by multiple physicians. We tried to minimize the effect of this limitation by performing a histopathological review of all cases. Third, another important limitation was the fact that CMV immunohistochemistry was not performed when these cases were originally evaluated, which limits the evaluation of the effect of CMV infection on our results. Finally, additional clinical characteristics of GI aGVHD such as anorexia, nausea, and vomiting were not systematically described in all medical records. Since severe diarrhea is normally in the end of the severity spectrum of GI aGVHD, we believe that this limitation does not preclude the characterization of aGVHD severity in our population.

In conclusion, we described the most frequent histological alterations in the GI tract in a cohort of consecutive patients with the diagnosis of GI aGVHD, and validated the association between severe crypt loss with GI aGVHD severity in an independent population.

Author contributions

Formal analysis: Luciana Rodrigues de Meirelles, Rita B.

Carvalho, Marcos Paulo Colella, Francisco Jose Penteadro Aranha, Afonso Celso Vigorito, Erich Vinicius De Paula.

Investigation: Loredana Nilkenes Gomes da Costa, Carolina Costa-Lima, Rita B. Carvalho, Erich Vinicius De Paula.

Methodology: Loredana Nilkenes Gomes da Costa, Carolina Costa-Lima, Afonso Celso Vigorito, Erich Vinicius De Paula.

Project administration: Erich Vinicius De Paula.

Supervision: Erich Vinicius de Paula, Luciana Meirelles, Rita B. Carvalho, Francisco Jose Penteadro Aranha.

Validation: Luciana Meirelles, Rita B. Carvalho.

Visualization: Erich Vinicius de Paula, Loredana Nilkenes Gomes da Costa, Rita B. Carvalho.

Writing – original draft: Loredana Nilkenes Gomes da Costa, Afonso Celso Vigorito, Erich Vinicius De Paula.

Writing – review and editing: Marcos Paulo Colella, Erich Vinicius de Paula, Loredana Nilkenes Gomes da Costa.

References

- [1] Blazar B, Murphy W, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12:443–58.
- [2] Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550–61.
- [3] Dignan FL, Clark A, Amrolia P, et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2012;158:30–45.
- [4] Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295–304.
- [5] Przepiora D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825–8.
- [6] Cahn JY. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) pros. *Blood* 2005;106:1495–500.
- [7] Johansson JF, Ekman T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients. *Dig Dis Sci* 2007;52:2340–5.
- [8] Koyama M, Kuns RD, Oliver SD, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* 2011;18:135–42.
- [9] Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, et al. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:1373–83.
- [10] Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, et al. ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N Engl J Med* 2013;369:529–39.
- [11] Levine JE, Huber E, Hammer ST, et al. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood* 2013;122:1505–9.
- [12] Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2011;118:6702–8.
- [13] Melson J, Jakate S, Fung H, et al. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 2007;82:881–6.
- [14] Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1628–33.
- [15] Sale GE, Shulman HM, McDonald GB, et al. Gastrointestinal graft-versus-host Disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 1979;3:291–9.
- [16] Wong NA. Gastrointestinal pathology in transplant patients. *Histopathology* 2015;66:467–79.
- [17] Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Hum Pathol* 2009;40:909–17.
- [18] Lerner KG, Kao GF, Storb R, et al. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant Proc* 1974;6:367–71.
- [19] Schulenburg A, Turetschek K, Weba F, et al. Early and late gastrointestinal complications after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2004;83:101–6.
- [20] Snover DC. Mucosal damage simulating acute graft-versus-host reaction in cytomegalovirus colitis. *Transplantation* 1985;39:669–70.
- [21] Mills AM, Guo FP, Copland AP, et al. A comparison of CMV detection in gastrointestinal mucosal biopsies using immunohistochemistry and PCR performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am J Surg Pathol* 2013;37:995–1000.
- [22] Nguyen CV, Kastenber DM, Choudhary C, et al. Is single-cell apoptosis sufficient for the diagnosis of graft-versus-host disease in the colon? *Dig Dis Sci* 2007;53:747–56.
- [23] Lin J, Fan R, Zhao Z, et al. Is the presence of 6 or fewer crypt apoptotic bodies sufficient for diagnosis of graft versus host disease? A decade of experience at a Single Institution. *Am J Surg Pathol* 2013;37:539–47.
- [24] Shidham VB, Chang CC, Shidham G, et al. Colon biopsies for evaluation of acute graft-versus-host disease (A-GVHD) in allogeneic bone marrow transplant patients. *BMC Gastroenterol* 2003;3:5.
- [25] Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, et al. NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:589–603.
- [26] Socie G. Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood* 2004;103:50–7.

Apêndice 4 – Outras publicações com participação da aluna durante o doutorado

FERREIRA, F. L. B., COLELLA, M. P., MEDINA, S. S., COSTA-LIMA, C., FIUSA, M. M. L., **COSTA, L. N. G.**, DE PAULA, E. V. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias. Scientific Reports.v.7, p.3355, 2017.

HOUNKPE, BIDOSSESSI WILFRIED; FIUSA, M M L; COLELLA, MARINA PEREIRA; **NILKENES GOMES DA COSTA, LOREDANA**; BENATTI, RAFAELA DE OLIVEIRA; OLALLA SAAD, SARA T; Costa, Fernando Ferreira; DOS SANTOS, MAGNUN NUELDO NUNES; DE PAULA, E. V. Role of innate immunity-triggered pathways in the pathogenesis of Sickle Cell Disease: a meta-analysis of gene expression studies. Scientific Reports.v.5, p.17822 - , 2015.

9. ANEXOS

Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação estrutural da barreira epitelial em pacientes com doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda intestinal: exploração de novos mecanismos fisopatológicos

Pesquisador: Carolina Costa-Lima

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09157812.5.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.112.594

Data da Reiteração: 23/06/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda a projeto previamente aprovado neste CEP sob parecer n. 673.890

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer 673.890

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ou desconfortos adicionais, uma vez que se trata de coleta de dados retrospectivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora esclareceu que nas primeiras etapas deste projeto, foram avaliados níveis de citocinas inflamatórias no soro de pacientes com e sem doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHA). Além disso, foram coletadas amostras de epitélio intestinal de pacientes com DECHA durante colonoscopias realizadas com fins diagnósticos (uma primeira emenda ao projeto foi aprovada em Junho de 2014, consistindo em termo de consentimento livre e esclarecido específico para o grupo controle para as análises histopatológicas). Durante a realização do projeto, novas publicações demonstraram a importância da *avaliação de fatores clínicos e demográficos de pacientes com DECHA no período pre-transplante*. A emenda se refere à coleta

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** csp@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.112.594

retrospectiva de dados clínicos e demográficos de pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas, originalmente não prevista. No projeto original, foi prevista a coleta de dados clínicos e demográficos dos pacientes com diagnóstico de DECHa para os quais havia lâminas histológicas arquivadas no setor de anatomia patológica do Gastrocentro da Unicamp. Estes dados (de 25 pacientes) foram obtidos dos prontuários médicos com dispensa para obtenção do TCLE. O que se solicita nesta emenda é a autorização para estender esta coleta de dados retrospectivos para todos os pacientes submetidos a TCTH pela equipe do Hemocentro da Unicamp, entre 2010 e 2014, totalizando 100 pacientes. Isto permitirá uma análise mais detalhada e com um "n" suficiente para inferências estatísticas, dos fatores clínicos e demográficos associados à ocorrência de DECHa na população estudada. Esta coleta será feita nos prontuários médicos dos pacientes submetidos a TCTH alogênico entre janeiro de 2010 e Dezembro de 2014 na Unidade de TCTH do HC Unicamp. Os dados serão obtidos de forma codificada de modo a preservar a privacidade da identidade dos pacientes. Os dados serão registrados na mesma tabela Excel utilizada para registro dos dados dos pacientes inseridos prospectivamente no estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexada nova folha de rosto, mas a mesma não é obrigatória para a emenda.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitação e documentos adequados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.112.594

pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.112.594

CAMPINAS, 18 de Junho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br




Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 21 de setembro de 2017.

Of. CEP/PRP/Nº 198/2017

NOTIFICAÇÃO
TRANSFERÊNCIA DE RESPONSABILIDADE DE
PROJETO DE PESQUISA

Tem este documento a finalidade de informar que o projeto de pesquisa "AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA BARREIRA EPITELIAL EM PACIENTES COM DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO (DECH) AGUDA INTESTINAL: EXPLORAÇÃO DE NOVOS MECANISMOS FISOPATOLÓGICOS", cadastrado na Plataforma Brasil sob número CAAE: 09157812.5.0000.5404, estará sob a responsabilidade da Dra. Loredana Nilkenes Gomes da Costa, em substituição ao Dra. Carolina Costa-Lima, conforme solicitação recebida por este CEP através da Plataforma Brasil.

Atenciosamente,


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP