

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TERAPIA CELULAR ALOGÊNICA: TRANSPLANTE  
DE FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA  
APÓS PRÉ-CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E  
CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS  
PORTADORES DE *Toxoplasma gondii***

**TESE DE DOUTORADO**

**Alfredo Skrebsky Cezar**

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2014**

**TERAPIA CELULAR ALOGÊNICA: TRANSPLANTE DE  
FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS PRÉ-  
CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E  
CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS PORTADORES  
DE *Toxoplasma gondii***

**Alfredo Skrebsky Cezar**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

**Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

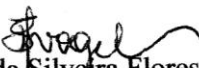
**TERAPIA CELULAR ALOGÊNICA: TRANSPLANTE DE FRAÇÃO  
MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS PRÉ-  
CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA EM  
CAMUNDONGOS PORTADORES DE *Toxoplasma gondii***

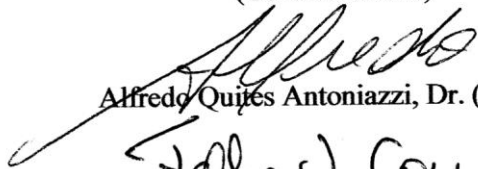
elaborada por  
**Alfredo Skrebsky Cezar**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
**Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
**Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)**  
(Co-orientadora)

  
**Alfredo Quirós Antoniazzi, Dr. (UFSM)**

  
**Fábio Vasconcellos Comim, Dr. (UFSM)**

  
**Irina Lübeck, Dr. (UNIPAMPA)**

  
**Luciana Maria Fontanari Krause, Dr. (UNIFRA)**

Santa Maria, 08 de Agosto de 2014.

## Agradecimentos

Agradeço a toda a equipe de pós-graduandos e bolsistas do BioRep com quem compartilhei quatro anos de trabalho, de alegrias e de momentos de dificuldades que, juntos, superamos. Aos professores Fábio e Alfredo que se uniram a nós nessa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Bayard, pela oportunidade que me proporcionou de fazer parte de um time de sucesso e excelência em pesquisa científica, pelos conselhos e pela compreensão ao longo dessa jornada de quatro anos de aprendizado, e por não medir esforços para que tenhamos toda a estrutura, os recursos e o apoio científico no âmbito Nacional e internacional para a realização do nosso trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. João Francisco (*in memoriam*), pelo exemplo de trajetória e de vida, por ter deixado um elo de amizade, entre todos nós que com ele convivemos no BioRep, que jamais será desfeito. Ao Prof. João seguimos recorrendo, em nossos pensamentos, toda a vez que nos abatemos por algum motivo no trabalho. Sua memória é o alento que nos impulsiona a ver a ciência e a vida pelo melhor lado.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Fernanda, por tomar para si os nossos desafios e estar sempre pronta a ajudar, pelo incentivo, pelas ideias e contribuições, pelo empenho e perseverança no objetivo de levar o trabalho ao melhor patamar possível, na superação dos obstáculos que se impõem a toda a caminhada.

À Maria, melhor secretária com quem o PPGMV poderia contar, por colocar sua competência, organização e empenho todos os dias à disposição de nossos estudos e pesquisas, e pelo profissionalismo e cuidado com que trata dos assuntos do PPGMV.

Aos talentosos e competentes colegas Werner e Karina com quem compartilhei todos os desafios que enfrentamos no estabelecimento dessa linha de pesquisa.

Aos bolsistas Carlise, Paulo Afonso e Katerine que estiveram ao meu lado ao longo das fases de execução deste trabalho, sempre empenhados e dedicados a fazer o melhor e sem medir esforços para que nossos objetivos se concretizassem.

À equipe do LADOPAR pelo companheirismo, pela troca de experiências e pela participação e ajuda nos experimentos.

À equipe do Prof. Paulo Pacheco pela contribuição essencial na área estatística.

Ao setor de Hemato-Onco do Hospital Universitário pelo material gentilmente cedido.

À minha namorada Fernanda por todo o apoio nessa fase decisiva da minha vida, por ter compartilhado cada dia deste caminho.

Aos meus familiares, Angela, Heraldo (pai), Heraldo (irmão), Felipe, Henrique, Gustavo e Adriane, por não medirem esforços para que essa etapa de minha vida pudesse ser concluída.

À minha segunda família Alice, Nelson, Juliana, Raquel e tias Nair e Noeli por me acolherem em uma fase decisiva da vida, no início da caminhada de estudos.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **TERAPIA CELULAR ALOGÊNICA: TRANSPLANTE DE FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS PRÉ-CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE *Toxoplasma gondii***

AUTOR: ALFREDO SKREBSKY CEZAR  
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES  
Santa Maria, 08 de Agosto de 2014.

O estudo da dinâmica das populações celulares indiferenciadas, presentes no organismo ao longo da vida, ampliou a fronteira de alternativas para o tratamento de vários tipos de lesões e de doenças. Diversas populações celulares têm sido usadas para isso, como as derivadas de embriões em fase de pré-implantação, denominadas células-tronco embrionárias (CTE); as derivadas de nichos de células somáticas pluripotentes, responsáveis pela regeneração dos tecidos orgânicos ao longo da vida, chamadas de células-tronco adultas (CTA); e as células da fração mononuclear da medula óssea (CFMO), que conta com CTA e células da linhagem hematopoiética em variados estágios de diferenciação. Importantes obstáculos têm sido superados no que se refere ao conhecimento de benefícios e de riscos inerentes à terapia celular. Contudo, a construção do conhecimento é permeada de dúvidas e há muito a ser desvendado para que se possam explorar com segurança as potencialidades das terapias celulares, especialmente usando células alogênicas. A toxoplasmose é uma zoonose oportunista causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que apresenta distribuição mundial e acomete cerca de um terço da população humana. Na fase aguda da infecção, taquizoítos de *T. gondii* disseminam-se e multiplicam-se nas células hospedeiras. A resposta imune induz a evasão do protozoário em cistos teciduais de bradizoítos (forma de semilatência), mantendo o hospedeiro cronicamente infectado. A imunossupressão, como a utilizada no pré-condicionamento para transplante de células alogênicas, é um fator de risco de reativação da toxoplasmose em portadores crônicos. Na presente tese, são apresentados estudos realizados com objetivo de contribuir com: *a.* métodos de detecção molecular de células alogênicas após o transplante sistêmico pela via endovenosa, permitindo o mapeamento da distribuição e do destino destas células no organismo receptor; e *b.* compreensão das inter-relações envolvendo pré-condicionamento (imunossupressão farmacológica) para o transplante, terapia celular alogênica com CFMO e reativação da toxoplasmose em portadores crônicos. No Capítulo 1 demonstra-se uma *nested*-PCR que aumenta a sensibilidade e a segurança do diagnóstico molecular de presença ou ausência de células de camundongos machos em fluidos e tecidos de receptoras fêmeas após transplante endovenoso. O método, que envolve a detecção de fragmento de DNA específico do cromossomo Y, foi eficaz para células de duas populações distintas: CFMO e células cultivadas *in vitro* derivadas do tecido adiposo. Portanto, o método pode ser útil para outros tipos celulares. O estudo apresentado no Capítulo 2 demonstra os efeitos de um protocolo de imunossupressão farmacológica com altas doses de busulfan e ciclofosfamida (PCT), seguido do transplante alogênico de CFMO em um modelo de toxoplasmose crônica em camundongos. Esse estudo foi dividido em três etapas subsequentes: I. infecção experimental com cepa cistogênica do tipo II de *T. gondii* (ME-49) e

caracterização da toxoplasmose aguda e crônica; II. avaliação dos efeitos da imunossupressão farmacológica nas fêmeas Balb/c; e III. avaliação dos efeitos do transplante de CFMO de camundongos machos para as fêmeas receptoras. A imunossupressão farmacológica provocou agravamento do quadro clínico geral dos animais e altas taxas de mortalidade. Esse efeito foi notavelmente precoce nos animais cronicamente infectados por *T. gondii*, demonstrando o alto risco da combinação entre toxoplasmose persistente e imunossupressão farmacológica na preparação para o transplante alogênico. Demonstrou-se a segurança do transplante alogênico de CFMO em fêmeas Balb/c infectadas ou livres de infecção por *T. gondii*, desde que não tenham sido submetidas ao protocolo de pré-condicionamento para o transplante. No Capítulo 3, um regime de imunossupressão farmacológica com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>) foi testado como alternativa para minimizar os riscos inerentes ao pré-condicionamento em camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* e submetidos ao transplante alogênico de CFMO. Esse estudo também foi dividido em três etapas sequenciais: I. infecção oral de fêmeas Balb/c com cistos teciduais de *T. gondii* (cepa VEG, cistogênica) e monitoramento durante um período de 120 dias (toxoplasmose crônica); II. avaliação dos efeitos do regime de pré-condicionamento, com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>); III. transplante alogênico endovenoso de CFMO de doadores machos para as fêmeas Balb/c. Os resultados demonstraram a segurança do PCT<sub>dr</sub> para uso em Balb/c fêmeas cronicamente infectadas com *T. gondii*. Doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>) resultaram em menor incidência e intensidade de sinais clínicos e ausência de mortalidade, em oposição ao ocorrido com as altas doses (PCT) recomendadas para mieloablação. O transplante alogênico de células mononucleares da medula óssea de doadores machos foi seguro no curto prazo em fêmeas Balb/c submetidas ao PCT<sub>dr</sub>, independentemente de infecção persistente pelo *T. gondii*.

**Palavras-chave:** terapia celular; alotransplante; diagnóstico molecular; toxoplasmose; reativação; imunossupressão farmacológica; Balb/c.

# ABSTRACT

Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

## **ALLOGENEIC CELL THERAPY: BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS TRANSPLANTATION AFTER BUSULFAN AND CYCLOPHOSPHAMIDE CONDITIONING IN MICE INFECTED BY *Toxoplasma gondii***

AUTHOR: ALFREDO SKREBSKY CEZAR

ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Santa Maria, August, 08<sup>th</sup>, 2014.

The study concerning the lifelong dynamic of undifferentiated cell populations present in the organism expanded the therapeutics frontiers aiming to healing several kinds of wounds and diseases. Different cell populations have been used for this purpose, as those derived from pre-implantation embryos, called embryonic stem cells (ESC); those derived from pluripotent somatic cells niches, responsible for organic regeneration throughout life, named adult stem cells (ASC); and cells derived from the bone marrow mononuclear fraction (BMNC), which has ASC and hematopoietic lineage cells at different stages of differentiation. Important barriers have been overcome aiming to elucidate benefits and risks inherent to cell therapy. However, the knowledge derives from an evolution process fraught with doubts, and there are many things to be unveiled for safe exploration of different kinds of cell therapy, mainly when allogeneic cells are used. Toxoplasmosis is an opportunistic zoonosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, which has a worldwide distribution and affects about a third of the human population. In the acute infection, *T. gondii* tachyzoites spread up and multiply themselves into host cells. Immune response leads to evasion of the protozoan in tissue cysts of (semi-latent) bradyzoites, maintaining the chronic infection of the host. Immunosuppression, as used in conditioning for allogeneic cells transplantation, is a risk factor for toxoplasmosis reactivation in chronically infected hosts. The studies presented in this thesis were performed aiming to contribute with: *a.* methods used for molecular detection of allogeneic cells after systemic transplantation by endovenous injection, allowing to mapping the organic distribution and the fate of these cells in recipient body; and *b.* understanding about interrelationships among conditioning (pharmacological immunosuppression) for transplantation, allogeneic cell therapy with BMNC and toxoplasmosis reactivation in chronically infected hosts. The study described in the Chapter 1 shows a nested-PCR test with increased sensitivity and assurance for molecular diagnosis of presence or absence of male mice cells in body fluids and tissues of female recipients after intravenous transplantation. This method, based on detection of specific DNA fragment from the Y chromosome, was effective for cells from two distinct populations: BMNC and in vitro cultured cells derived from adipose tissue. Therefore, this method can be suitable for other cell types. The study presented in the Chapter 2 shows the effects caused by an immunosuppressive pharmacological regimen with high doses of busulfan and cyclophosphamide (PCT), followed by allogeneic BMNC transplantation in a model of chronic toxoplasmosis in mice. This study was divided in three subsequent steps: I. experimental infection with type II cystogenic strain of *T. gondii* (ME-49) and characterization of acute and chronic toxoplasmosis; II. evaluation of the pharmacological immunosuppression effects in female Balb/c; and III. evaluation of the effects resulting from

transplantation of male mice BMNC to recipient females. The pharmacological immunosuppression caused worsening of the general clinical condition of the animals and high mortality rates. This effect occurred remarkably earlier in animals chronically infected with *T. gondii*, showing the high risk of the combination between persistent toxoplasmosis and pharmacological immunosuppression in conditioning for allogeneic transplantation. This study showed the safety of the allogeneic BMNC transplantation in female Balb/c independently of the infection by *T. gondii*, provided that they have not been subjected to conditioning regimen before transplantation. In the Chapter 3, a pharmacological immunosuppressive regimen, with reduced doses of busulfan and cyclophosphamide (PCTrd), was tested as an alternative to minimize conditioning regimen inherent risks in mice chronically infected with *T. gondii* and submitted to allogeneic transplantation of BMNC. This study was also divided in three sequential steps: I. oral infection of female Balb/c with tissue cysts of *T. gondii* (cystogenic VEG strain) and monitoring over a 120 days period (chronic toxoplasmosis); II. evaluation of conditioning regimen effects using reduced doses of busulfan and cyclophosphamide (PCTrd); III. endovenous transplantation of allogeneic BMNC from male donors to the female Balb/c. The results showed the safety of the PCTrd for use in female Balb/c chronically infected with *T. gondii*. Reduced doses of busulfan and cyclophosphamide (PCTrd) resulted in lower incidence and intensity of clinical signs and absence of mortality, in contrast to results that were observed with high doses (PCT) recommended for myeloablation. Transplantation of allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells from male donors was safe in the short term for female Balb/c mice submitted to PCTrd regardless of persistent infection by *T. gondii*.

**Key words:** cell therapy; allotransplantation; molecular diagnosis; toxoplasmosis; reactivation; pharmacologic immunosuppression; Balb/c.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- (A) ADSC-Y cell culture (200x magnification); (B) ADSC-Y after osteogenic differentiation induction (note areas of calcium deposition stained with 2% Alizarin Red; 200x magnification); (C) Electrophoretic analysis after first-step PCR (multiplex): visualization of the external fragment (300bp) from SRY gene in column 1 (DNA from ADSC-Y culture) and visualization of the polymorphic fragment (244/270bp) from DXNds3 gene in columns 1, 2 (ADSC-Y recipient lung), 3 (BMNC-Y recipient lung) and 4 (ADSC-Y recipient blood); (D) Electrophoretic analysis after nested-PCR: visualization of the internal fragment (110bp) from SRY gene in columns 1 (ADSC-Y recipient lung), 2 (DNA from ADSC-Y culture), 3 (BMNC-Y recipient lung), 4 (ADSC-Y recipient blood); visualization of a 300bp fragment remaining from the first-step PCR in column 2 (DNA from ADSC-Y culture). For DNA length estimation, 7µl of 100bp DNA ladder (Amresco, USA) were applied in both columns 5 (Figures 1C and 1D)..... 41

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1- Número de sobreviventes na fase aguda da infecção em fêmeas Balb/c, das quais: 42 receberam 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49) no dia 0 pela via oral (infectadas); e 20 foram mantidas como controles (não-infectadas). A mortalidade entre os dias 0 e 1 não foi atribuída à infecção por *T. gondii*, mas ao procedimento de inoculação oral por gavagem..... 59
- FIGURA 2- Peso vivo médio de fêmeas Balb/c infectadas por *T. gondii* e não-infectadas (controles), 85 dias depois da inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49). Letras diferentes (a, b) indicam diferença entre médias de peso vivo pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0.0001$  com intervalo de confiança de 95%..... 60
- FIGURA 3- Frequência e intensidade de sinais clínicos, considerando-se o percentual de sobreviventes, a partir do início do pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT) em fêmeas Balb/c infectadas por *T. gondii* e não-infectadas. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Letras diferentes (a, b) indicam frequências diferentes em um mesmo grupo ao longo dos dias, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado..... 61
- FIGURA 4- Percentual de sobreviventes a partir do início do pré-condicionamento para o

- transplante alogênico (PCT) até o dia do transplante de BMy. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). O asterisco (\*) indica que txI+pctII é diferente dos demais grupos no dia 93 p.i., pelo teste do qui-quadrado com  $p < 0,1$ ..... 62
- FIGURA 5- Variação do peso vivo médio por grupo durante o período de pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT). txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0,05$ . (\*) Os grupos plaI+plaII e txI+plaII são diferentes de txI+pctII. (\*\*) Os grupos plaI+plaII e txI+plaII são diferentes de plaI+pctII e txI+pctII..... 63
- FIGURA 6- Consumo médio diário de ração por animal por grupo. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Nota-se que os animais diminuíram drasticamente o acesso à ração no comedouros como consequência do tratamento com busulfan..... 64
- FIGURA 7- Intensidade dos sinais clínicos por animal ao longo dos períodos pré-transplante (dias 86 a 92 p.i.) e pós-transplante (dias 93 a 101 p.i.). txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). A intensidade de cada matiz representa os sinais clínicos: ausentes (claro); leves (cinza claro); moderados (cinza escuro); graves/extremos (preto). O final da coluna indica morte do animal..... 65
- FIGURA 8- Cisto de bradizoítos (estrutura esférica ao centro, em destaque) encontrado em lâmina de tecidos encefálicos de camundongo fêmea Balb/c cronicamente infectada com *T. gondii*. Aumento de 200x..... 66

### CAPÍTULO 3

- FIGURA 1- Média de peso vivo de fêmeas Balb/c aos 120 dias pós-inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* da cepa VEG (grupo TgI) ou de placebo (grupo plaI). Letras (a,b) diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer..... 81
- FIGURA 2- Variação do peso médio de cada animal, por grupo, durante o período do PCT<sub>dr</sub> (etapa II). TgI: infectadas na etapa I; pct<sub>dr</sub>II: submetidas ao PCT<sub>dr</sub> na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não

receberam o PCT*dr*). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0,05$ . (\*) O grupo TgI+plaII é diferente do grupo plaI+pctdrII. (\*\*) Os grupos TgI+plaII e plaI+plaII são diferentes do grupo plaI+pctdrII. (\*\*\*) O grupo TgI+plaII é diferente dos grupos TgI+pctdrII e plaI+pctdrII; e o grupo plaI+plaII é diferente do grupo plaI+pctdrII..... 82

- FIGURA 3- Frequência e intensidade de sinais clínicos durante regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT*dr*) em camundongos fêmeas Balb/c infectadas ou livres de infecção por *T. gondii*. TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCT*dr* na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT*dr*). Nota-se que os sinais clínicos vão de ausentes a leves. Letras diferentes (a,b) indicam frequências diferentes em um mesmo grupo ao longo dos dias, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado..... 83
- FIGURA 4- Variação média de peso diária por animal para cada grupo experimental na etapa III, abrangendo o transplante e o período pós-transplante (p.t.). TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCT*dr* na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT*dr*); bmyIII: receberam transplante de células BMy na etapa III; plaIII: placebo na etapa III (não receberam transplante)..... 84
- FIGURA 5- Consumo médio diário de ração por animal para cada grupo experimental da etapa III, considerando-se: (A) o histórico dos animais no pré-transplante; e (B) o período pós-transplante (p.t.). TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCT*dr* na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT*dr*); bmyIII: receberam transplante de células BMy na etapa III; plaIII: placebo na etapa III (não receberam transplante). Nota-se que o padrão de consumo se mantém sem alterações dignas de nota. Exceto por reduções transitórias no grupo TgI+pctdrII+bmyIII..... 85
- FIGURA 6- Frequência e intensidade de sinais clínicos, individualizadas por animal, em cada grupo experimental de camundongos Balb/c fêmeas durante o período pós-transplante (etapa III). A intensidade do matiz representa a intensidade dos sinais clínicos..... 86
- FIGURA 7- Cistos de bradizoítos (estruturas esféricas ao centro, em destaque) encontrados em lâminas de tecidos encefálicos de camundongos fêmeas Balb/c cronicamente infectadas com *T. gondii* da cepa VEG (cistogênica). Aumento de 200x..... 87

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1-	Curso clínico e taxa de mortalidade na fase aguda da infecção por <i>T. gondii</i> pós-inoculação (p.i.) oral de 50 cistos teciduais da cepa ME-49, em camundongos fêmeas Balb/c .....	56
TABELA 2-	Curso clínico na fase crônica da infecção por <i>T. gondii</i> pós-inoculação (p.i.) oral de 50 cistos teciduais da cepa ME-49, em camundongos fêmeas Balb/c.....	57
TABELA 3-	Frequência de sinais clínicos (sobre o percentual de animais sobreviventes) a partir do início do protocolo de imunossupressão farmacológica (PCT) em camundongos Balb/c fêmeas infectados ou livres de infecção por <i>T. gondii</i> .....	58

### CAPÍTULO 3

TABELA 1-	Descrição e análise estatística da variação média de peso por animal (em gramas) para cada grupo experimental na etapa III do estudo, no período pós-transplante (p.t.).....	84
-----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADSC-Y: adipose-derived stromal (stem) cells from male donors
- BMNC-Y: bone marrow-derived mononuclear cells from male donors
- BM<sub>y</sub>: (células da) fração mononuclear da medula óssea de camundongos machos
- CEMO: célula do estroma da medula óssea
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFMO: células da fração mononuclear da medula óssea
- CFMO-Y: células da fração mononuclear da medula óssea de doadores machos
- CONCEA: Conselho Nacional de Experimentação Animal
- CTA: célula(s)-tronco adulta(s)
- CTDA: células-tronco derivadas do tecido adiposo
- CDTA-Y: células estromais (tronco) derivadas do tecido adiposo de doadores machos
- CTE: célula(s)-tronco embrionária(s)
- CTHMO: célula(s)-tronco hematopoiética(s) derivada(s) da medula óssea
- CTM: célula(s)-tronco mesenquimal(is)
- DEMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
- EPR: epitélio pigmentar retiniano
- hCTE: célula(s)-tronco embrionária(s) humana(s)
- PBS: phosphate-buffered saline ou tampão salina-fosfato
- PCR: polimerase chain reaction
- PCT: protocolo (regime) de pré-condicionamento para o transplante alogênico
- PCT<sub>dr</sub>: protocolo (regime) de pré-condicionamento para o transplante alogênico com doses reduzidas dos quimioterápicos
- p.i.: pós-infecção
- p.t.: pós-transplante
- qPCR: quantitative polimerase chain reaction
- SKP: (células) progenitoras derivadas da pele
- SRY: Y-located testis-determining gene
- SRY<sub>inn</sub>: SRY gene inner DNA fragment sequence
- SRY<sub>out</sub>: SRY gene outer DNA fragment sequence

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	18
<b>2.1 A terapia celular na clínica médica e veterinária.....</b>	18
2.1.1 Células-tronco embrionárias.....	18
2.1.2 Os ensaios clínicos com células-tronco embrionárias.....	19
2.1.3 Células-tronco adultas.....	20
2.1.4 Transplante de células derivadas da medula óssea.....	23
<b>2.2 A toxoplasmose na saúde humana e animal.....</b>	24
2.2.1 Biologia da toxoplasmose: uma zoonose oportunista.....	24
2.2.2 A toxoplasmose em pacientes de transplantes alogênicos.....	26
<b>3 CAPÍTULO 1 - NESTED-PCR MULTIPLEX TEST WITH INCREASED SENSITIVITY FOR DETECTION OF ALLOGENEIC CELLS TRANSPLANTED FROM MALE TO FEMALE MICE .....</b>	28
Abstract.....	28
Resumo.....	29
Introduction.....	30
Material and Methods.....	31
Results and Discussion.....	35
Conclusion.....	37
Acknowledgements.....	37
References.....	37
<b>4 CAPÍTULO 2 – PRÉ-CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA E TRANSPLANTE ALOGÊNICO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	42
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	49
Conclusões.....	52
Agradecimentos.....	52
Referências.....	53
<b>5 CAPÍTULO 3 - DOSES REDUZIDAS DE BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA NO PRÉ-CONDICIONAMENTO PARA O TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS PORTADORAS DE <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	68
Resumo.....	68
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Material e Métodos.....	71
Resultados e Discussão.....	74
Conclusão.....	77
Agradecimentos.....	77
Referências.....	78
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	88
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	89

## 1. INTRODUÇÃO

Algumas das maiores perspectivas de avanços para a recuperação funcional de órgãos e tecidos, a regeneração orgânica, o tratamento de lesões com perda tecidual e o controle de doenças relacionadas à resposta imune residem na terapia celular (LE BLANC; RINGDEN, 2007; MALGIERI et al., 2010; REINOLDS; LAMBA, 2014). As populações celulares utilizadas para esses fins terapêuticos apresentam, em geral, a característica de se encontrarem indiferenciadas (ou em estágios iniciais de diferenciação) em seu nicho original. Isso permite que sejam estimuladas para a diferenciação em variados tipos de células especializadas (BRADLEY, 1990; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005; CARR et al., 2013). Dessa forma, as células embrionárias e somáticas adultas indiferenciadas podem dar origem a linhagens celulares diferentes daquelas a que estariam “destinadas” a formar, em um processo de transdiferenciação mediado por estímulos específicos (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

À capacidade de se diferenciar em células de diversas linhagens (originárias de ectoderma, mesoderma e endoderma) se denomina “plasticidade”. Teoricamente, sob os estímulos adequados, as células indiferenciadas poderiam dar origem a quaisquer tipos celulares que formam um organismo. Contudo, acredita-se que, na prática, a plasticidade das diferentes populações de células somáticas adultas indiferenciadas ou precursoras seja variável e apresente certas limitações (HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005; WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Dessa forma, a plasticidade, ou seja, o potencial de diferenciação (transdiferenciação) permite a classificação dos tipos celulares em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (MITALIPOV; WOLF, 2009). Células derivadas de embriões em fase de pré-implantação são as que apresentam o espectro mais amplo de diferenciação, sendo consideradas totipotentes. O conceito de totipotência significa que essas células são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular desde a formação do organismo embrionário, fetal e adulto, incluindo tecidos extra-embriônicos da placenta. As células pluripotentes são as que apresentam capacidade de se diferenciar em células maduras derivadas das três linhagens germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma). Embora sejam capazes de se diferenciar em diferentes tipos de células somáticas, as células multipotentes têm uma plasticidade reduzida em comparação às pluripotentes. Assim, teoricamente, não seria possível formar todos os tecidos orgânicos a partir de uma célula pluripotente ou multipotente (BONGSO; RICHARDS, 2004; MITALIPOV; WOLF, 2009).

Pode-se considerar que, no momento, a maioria dos estudos relacionados a terapia celular envolve algum dos três tipos de populações celulares mencionados a seguir: as células-tronco embrionárias (CTE) (CARR et al., 2013; REYNOLDS; LAMBA, 2014; SCHULDINER et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2012), as células-tronco adultas (CTA) (BONGSO; RICHARDS, 2004; MALGIERI et al., 2010; MEISEL et al., 2004; ROJAS et al., 2005;) e as células da fração mononuclear da medula óssea (CFMO) (KAMIHATA et al., 2001; SEEGER et al., 2007; TATEISHI-YUYAMA et al., 2002). Embora, recentemente, os ensaios clínicos em seres humanos tenham passado a ser cada vez mais comuns, ainda há muitas dúvidas referentes aos reais benefícios e riscos da terapia celular.

Os métodos de expansão e diferenciação em cultivo celular das células-tronco formando populações quase puras de células especializadas têm se tornado mais eficazes (REYNOLDS; LAMBA, 2014). Essa engenharia de tecidos possibilita o transplante de populações celulares funcionalmente especializadas, como realizado, experimentalmente, no tratamento da degeneração de retina em humanos (SCHWARTZ, 2012). Por outro lado, em muitos casos, parece ser preferível usar células com alta capacidade de diferenciação (plasticidade). Isso porque, tais células apresentam um repertório mais amplo de potenciais efeitos, como a formação de vários tecidos, a modulação da resposta imune e a produção de fatores de crescimento que estimulam a regeneração tecidual (MALGIERI et al., 2010).

Há evidências suficientes para apostar que a cura de diversas doenças, a reparação tecidual e a regeneração orgânica, em casos para os quais ainda não se tem tratamento eficaz, pode residir na terapia celular. Contudo, o conhecimento científico gerado até o momento segue permeado de lacunas referentes à efetividade das células-tronco e de outras populações celulares, como a fração mononuclear da medula óssea, para fins terapêuticos. Além disso, as células-tronco, por característica, pela sua plasticidade, também são inerentemente capazes de induzir a formação tumores (KARNOUB et al., 2007; SMITH, 2001; TOLAR et al., 2007).

O transplante de células alogênicas tem como outro fator complicador o risco de provocar rejeição. Isso parece ser um problema menos frequente na terapia alogênica com células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais da medula óssea, o que tem sido atribuído ao seu efeito imunomodulador e sua baixa antigenicidade (DEEG et al., 2006; MALGIERI et al., 2010). Nesse contexto, há grande necessidade de estabelecer conhecimentos básicos acerca das inter-relações existentes entre as células transplantadas, na terapia celular, e as células do organismo que as recebe. Isso no que se refere, por exemplo, à sinalização parácrina, distribuição das células transplantadas no organismo, resposta imune e eliminação das células alogênicas (no caso da origem não ser autóloga). Para tanto, se faz



necessário desenvolver e aprimorar métodos de diagnóstico que permitam estudar o destino das células transplantadas no organismo receptor.

O potencial imunomodulador das CTA passou a ser usado para regular a resposta imunológica por meio da terapia celular, como uma nova opção terapêutica (LE BLANC; RINGDÉN, 2007; PUISSANT et al., 2005). Assim, considerando-se que a terapia celular pode interferir na capacidade de resposta imune do paciente, é importante destacar que doenças relacionadas à competência imunológica devem ser consideradas nesse cenário. Além disso, nos casos de transplantes alogênicos, como o de medula óssea, o pré-condicionamento do paciente para receber as células alogênicas inclui a imunossupressão farmacológica (KONUMA et al., 2014; RAIOLA et al., 2013). Isso resulta em mieloablação e tem o objetivo de proporcionar uma condição favorável ao estabelecimento das células transplantadas. Porém, também acarreta em uma condição de debilidade da resposta imunológica, que predispõe o paciente às infecções oportunistas como a toxoplasmose (ROEMER et al., 2001).

A toxoplasmose é uma zoonose provocada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Este parasito apresenta caráter altamente infeccioso em humanos e pode acometer, virtualmente, qualquer espécie de animal de sangue quente. A toxoplasmose está amplamente distribuída ao redor do mundo e provoca grande impacto à saúde pública (INNES, 1997; ROBERTS et al., 1990).

A infecção por *T. gondii*, em geral, costuma ser assintomática, e o portador pode manter-se livre de sinais clínicos ao longo da vida (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Porém, episódios de imunossupressão transitória ou doenças que causam comprometimento da resposta imunológica predispõem à disseminação do parasita pelo organismo, provocando doença aguda (AJZENBERG et al., 2009). Esse é o caso dos pacientes submetidos a transplantes alogênicos, os quais se encontram imunossuprimidos devido ao pré-condicionamento (mieloablação) para o transplante (DEROUIN; PELLOUX, 2008; ROEMER et al., 2001). Assim, a infecção primária ou a reativação da toxoplasmose crônica, com disseminação de taquizoítos do protozoário e manifestação de doença aguda, acarretam em sérios riscos ao paciente.

Os efeitos da terapia celular sobre a patogenia da toxoplasmose em portadores crônicos de *T. gondii*, bem como os riscos de reativação da infecção aguda em pacientes submetidos ao transplante de células alogênicas ainda precisam ser esclarecidos. Esta tese é composta de estudos relacionados (1) ao diagnóstico molecular da distribuição orgânica de células alogênicas transplantadas de camundongos machos para camundongos fêmeas; e (2) às inter-relações que se estabelecem entre a toxoplasmose crônica, o pré-condicionamento

com quimioterapia imunossupressora e o transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea em camundongos.

Os estudos apresentados nesta tese foram realizados com intuito de contribuir com o desenvolvimento da pesquisa em terapia celular utilizando modelos animais e avaliando os riscos e potenciais benefícios na relação entre a toxoplasmose, a imunossupressão farmacológica e o transplante de células alogênicas. Nesse sentido, este trabalho conta com uma revisão de literatura acerca dos avanços relacionados às potencialidades terapêuticas de células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e populações celulares derivadas da medula óssea. Na sequência, são apresentados estudos realizados com os objetivos de: *a.* desenvolver e aprimorar o diagnóstico molecular de presença/ausência de células alogênicas no organismo receptor, após transplante sistêmico (Capítulo 1); e *b.* de avaliar os riscos de reativação da toxoplasmose em portadores crônicos submetidos a diferentes regimes de pré-condicionamento (imunossupressão farmacológica), com os quimioterápicos busulfan e ciclofosfamida, e ao transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea (Capítulos 2 e 3). As conclusões gerais desses estudos são apresentadas em conjunto, no fechamento desta tese.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A terapia celular na clínica médica e veterinária

#### 2.1.1 Células-tronco embrionárias

Os estudos pioneiros de Evans e Kaufman (1981) com células isoladas da massa celular interna de blastocistos murinos, as quais se mantinham indiferenciadas ao serem expandidas *in vitro* e, além disso, apresentavam pluripotência (capacidade de se diferenciar formando quimerismo e teratocarcinomas *in vivo*), deram origem a uma nova fronteira científica. Desde então, essas células indiferenciadas e pluripotentes, que viriam a ser consagradas como *células-tronco embrionárias* (CTE), passaram a ser profundamente estudadas. Em um primeiro momento, esses estudos foram focados no objetivo de desvendar os processos de diferenciação celular que ocorrem desde o desenvolvimento embrionário (BRADLEY, 1990; EVANS; KAUFMAN, 1981).

No entanto, a evolução das pesquisas com essas populações celulares abriu perspectivas de novos métodos terapêuticos, capazes de promover a regeneração anatomo-funcional do organismo, com reparação de feridas, reconstrução de tecidos e tratamento de diversas doenças. Isso direcionou os esforços da comunidade científica para a pesquisa com células-tronco embrionárias humanas (hCTE), visando a sua proliferação em cultivo (indiferenciadas) e sua diferenciação em linhagens múltiplas de células progenitoras e somáticas do organismo (AMIT et al., 2000; REUBINOFF et al., 2000; SCHULDINER et al., 2000; THOMSON et al., 1998). A partir daí, consolidou-se o conceito de que populações originárias de poucas (ou mesmo de apenas uma) CTE podem ser propagadas *in vitro* indefinidamente, mantendo-se indiferenciadas e mantendo a capacidade de se diferenciar, virtualmente, em qualquer população de células somáticas adultas, caso sejam submetidas aos estímulos adequados (JOHE et al., 1996; SCHULDINER et al., 2000).

Os resultados obtidos em estudos com CTE geraram sólidas esperanças para a comunidade científica. Essas células passaram a ser celebradas como a alternativa mais promissora para o tratamento de lesões e de doenças até então incuráveis, ou para as quais os recursos terapêuticos conhecidos jamais apresentaram resultados satisfatórios (FUCHS; SEGRE, 2000). Contudo, a aplicabilidade da terapia com hCTE na clínica médica esbarrou em questões que vieram desde restrições de ordem ética e legal – por se tratarem de células coletadas de tecidos embrionários/fetais – (FUCHS; SEGRE, 2000; VOGEL, 2001), até

obstáculos bastante práticos, relacionados à segurança de sua utilização *in vivo*, eficácia do tratamento e relação entre os riscos e os possíveis benefícios aos pacientes. Apesar disso, não se pode negligenciar o potencial terapêutico de células-tronco embrionárias (VOGEL, 2001; REINOLDS & LAMBA, 2014): basta lembrar que as características dessas linhagens celulares em cultivo as tornam fontes autorrenováveis, e quase que inesgotáveis, de células pluripotentes.

Recentemente, um grande passo foi dado no sentido de resolver parte das questões éticas envolvidas na manipulação de células derivadas de embriões humanos, com o surgimento de métodos eficazes de produção de linhagens de hCTE a partir da biópsia de apenas um blastômero (KLIMANSKAYA et al., 2006). Com essa tecnologia, desenvolvida inicialmente com embriões murinos (CHUNG et al., 2005), tornou-se viável o estabelecimento de linhagens celulares pluripotentes a partir de biópsias de embriões humanos produzidos *in vitro*, sem provocar-lhes dano ou, sequer, atraso no desenvolvimento embrionário. Já se demonstrou que as hCTE derivadas de um blastômero multiplicam-se e mantêm-se indiferenciadas por diversas passagens em cultivo, e são capazes de originar as três camadas germinativas embrionárias, tanto *in vitro* quanto em teratomas nos modelos animais (KLIMANSKAYA et al., 2006).

Duas contribuições primordiais dessa técnica desenvolvida por Chung et al., (2005) e Klimanskaya et al. (2006) podem ser destacadas: (1) o estabelecimento e manutenção dessas linhagens celulares possibilita o acesso a grande quantidade de CTE (ou hCTE) multiplicadas em cultivo celular a partir de uma população gerada pela coleta por biópsia de apenas uma célula embrionária, e sem a destruição do embrião que a originou. Portanto, sem inviabilizar o desenvolvimento ou provocar a morte deste embrião, o que resolve grande parte das questões éticas envolvidas na utilização de hCTE; (2) esse embrião desenvolvido *in vitro*, que serve como doador do blastômero do qual derivam as hCTE, poderá dar origem a um indivíduo para o qual, dessa forma, manter-se-á um estoque de hCTE autólogas para terapias futuras.

### 2.1.2 Os ensaios clínicos com células-tronco embrionárias

A obtenção de linhagens de hCTE a partir de um único blastômero deu novo impulso à terapia celular em humanos, culminando nos ensaios clínicos para o tratamento da degeneração macular que se iniciaram em 2010 (ATALA, 2012; SCHWARTZ et al., 2012). Nesses estudos, foram aplicadas, no espaço sub-retiniano de cada paciente, 50000 células alogênicas do epitélio pigmentar retiniano (EPR), com pureza de 99% de EPR diferenciadas a

partir de cultivo de hCTE. O procedimento foi realizado em dois pacientes, cada um com um tipo de degeneração macular. Os resultados preliminares, após quatro meses de acompanhamento, foram bastante positivos: houve estabelecimento das células alogênicas no sítio de aplicação, recuperação histológica e funcional do epitélio macular e melhora da acuidade visual nos pacientes (CARR et al., 2013; SCHWARTZ et al., 2012).

Contudo, é essencial ressaltar que há muitas lacunas a serem preenchidas, e muitas dúvidas vitais a serem respondidas, para que se tenham garantias suficientes que permitam avançar em termos de aplicação de CTE (hCTE) em humanos. Nesse sentido, uma preocupação inerente ao uso de células alogênicas é a rejeição ao transplante (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2011; DRUKKER et al., 2006). Em relação aos estudos de Schwartz et al. (2012) é preciso considerar que o sítio de aplicação das células alogênicas, a retina, é também um sítio de privilégio, onde a resposta imunológica é restrita. Isso diminui o risco de rejeição às células alogênicas. Além disso, a aplicação é local (sub-retiniana) e a concentração de células aplicadas é pequena. Todos esses aspectos favorecem a terapia de regeneração de retina com hCTE, por restringirem os riscos ao paciente.

Apesar dos importantes passos dados recentemente na direção da ampliação dos ensaios clínicos em pacientes humanos (CHONG et al., 2014; REYNOLDS; LAMBA, 2014), de fato, ainda é necessário tratar do tema com cautela (ANDERSON et al., 2014). Além disso, embora ensaios pré-clínicos envolvendo modelos animais venham, em muitos casos, apresentando resultados animadores quanto à eficácia terapêutica das células embrionárias pluripotentes humanas (CHONG et al., 2014; LU et al., 2009; LUND et al., 2006), um problema central a ser destacado é o risco de formação de tumores. Esse risco é inerente a própria natureza pluripotente das células-tronco (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2011; LEE et al., 2013) e desabona seu uso indiscriminado em seres humanos.

### 2.1.3 Células-tronco adultas

Apesar das características bastante peculiares das CTE, que as tornam uma população celular extremamente valiosa para a diferenciação em linhagens somáticas diversas, os embriões em fase de pré-implantação não são as únicas fontes biológicas de células pluripotentes indiferenciadas. Durante o desenvolvimento embrionário e fetal, para a formação de todos os tecidos orgânicos, as células pluripotentes indiferenciadas de origem embrionária passam por uma série de transformações orquestradas por uma pré-programação do genoma. Essas transformações são próprias de cada tipo celular que será formado, dando

origem a um organismo multicelular completo (YOUNG; BLACK JR., 2004). Contudo, cada tecido formado a partir dessas transformações mantém nichos de células indiferenciadas ou progenitoras, chamadas de células-tronco adultas (CTA), prontas a se diferenciar em células especializadas, desde que sejam estimuladas para tal. As CTA podem ser classificadas como células indiferenciadas, pluripotentes e capazes de autorrenovação (SPRADLING et al., 2001; WAGERS; WEISSMAN, 2004).

A função fisiológica das CTA é a reparação e renovação dos tecidos orgânicos. Dos nichos de células pluripotentes quiescentes têm origem as novas células somáticas especializadas, constantemente produzidas para manutenção da homeostase orgânica (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005). O recrutamento das CTA para o desenvolvimento de células progenitoras que se tornarão células especializadas ocorre conforme o requerimento de cada tipo celular no organismo ao longo da vida (SPRADLING, DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001). Em condições naturais, o recrutamento das CTA não leva ao esgotamento desses estoques de células pluripotentes. Isso porque, as mesmas também são capazes de se multiplicar, mantendo-se indiferenciadas e, assim, promovendo a autorrenovação das populações de CTA em estoque (COLLINS et al., 2005).

As células-tronco adultas vêm adquirindo importância crescente na terapia de diferentes tipos de lesões e de doenças. Algumas limitações ao seu uso residem no risco de rejeição (na terapia alogênica), embora a imunogenicidade das CTA seja baixa e sua capacidade imunomoduladora seja reconhecida (DRUKKER et al., 2006; NAUTA et al., 2006); na possível perda de função das células infundidas, por ficarem submetidas a influências diferentes daquelas que encontrariam no seu nicho de origem (PISCAGLIA, 2008; SPRADLING, DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001); e no seu potencial de transformação neoplásica ou indução de tumores (BLUM et al., 2009; KARNOUB et al., 2007; TOLAR et al. 2007).

O potencial tumorigênico, característico de células pluripotentes, é um dos aspectos de maior preocupação no que diz respeito à aplicabilidade terapêutica das células-tronco. Neste quesito, as CTA tem se demonstrado mais seguras em comparação com as CTE. No entanto, esta é uma característica associada a sua menor plasticidade, ou seja, um espectro de diferenciação mais limitado (PISCAGLIA, 2008). Recentemente, novas luzes foram lançadas nesta relação: demonstrou-se que as hCTE induzidas a se diferenciar em células-tronco mesenquimais (CTM), apresentam características similares às de CTM isoladas de organismos adultos, e sem induzir ou formar tumores (GRUENLOH et al., 2011).

A medula óssea tem sido uma das principais fontes biológicas de CTA utilizadas para terapia celular (HERZOG, CHAI; KRAUSE, 2003; HORWITZ et al., 2002; MORRISON; SCADDEN, 2014). As características próprias das células estromais da medula óssea fizeram com que esse fosse o primeiro sítio de obtenção de CTA explorado para estudos de terapia celular autóloga e alogênica (HORWITZ et al., 2002; LALU et al., 2012; RAIOLA et al., 2013).

Em seu nicho originário, o estroma da medula óssea fornece o microambiente que favorece, concomitantemente, o balanço entre a autorrenovação da população de células-tronco (indiferenciadas) e sua diferenciação em células progenitoras hematopoiéticas, que darão origem às células especializadas (FUCHS, TUMBAR; GUASCH, 2004). Assim, no organismo, autorrenovação e diferenciação são características controladas de maneira dinâmica pelo nicho celular em que se encontram as CTA (MOORE; LEMISCHKA, 2006).

Inicialmente, acreditava-se que somente alguns tecidos orgânicos específicos, entre os quais se destacava a medula óssea, possuíam estoque de CTA. Com o passar dos anos, diversas outras fontes de CTA ou de células progenitoras multipotentes passaram a ser exploradas, como o tecido adiposo (células-tronco derivadas do tecido adiposo; CTDA) e a pele (células progenitoras derivadas da pele, conhecidas como células SKP) (PRESTON et al., 2003; PISCAGLIA, 2008). Hoje se sabe que populações de CTA estão presentes, virtualmente, em todos os tecidos orgânicos, embora nem todas as linhagens descritas tenham tido comprovada sua plasticidade para formar os diferentes tipos de células somáticas.

Alguns tipos de CTA que já tiveram sua plasticidade amplamente demonstrada são: as CTHMO, as neurais, as musculares esqueléticas, as mesenquimais (estromais, CTM), as CTDA e as SKP (BRZOSKA et al., 2005; RAFF, 2003; TOMA et al., 2001). As CTM, obtidas principalmente da medula óssea, possuem uma plasticidade ampla, comprovada pela formação de tecidos específicos como o cartilaginoso, o tendíneo, o ósseo, o adiposo, o muscular e o nervoso (MINGUELL et al., 2001).

Em se tratando de CTA, o risco de rejeição de células alogênicas transplantadas na terapia local ou sistêmica, interessantemente, não é um fator tão sério quanto se poderia esperar. Isso se deve ao fato dessas células apresentarem, como característica, um baixo potencial antigênico (o que também tem sido interpretado como efeito imunomodulador), que as protege da resposta imune. As CTM são as CTA mais amplamente estudadas no decorrer dos anos, tendo-se atribuído a essas células um papel especial em relação a modulação das reações imunológicas (CAPLAN, 1991; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2006). A capacidade das CTM de expressar inúmeros fatores de crescimento, citocinas e interleucinas

(DEANS; MOSELEY, 2000) parece ter relação com sua baixa imunogenicidade, uma vez que esses fatores de sinalização podem interferir na resposta imunológica do organismo que recebe o transplante celular.

Apesar de ser consensual a ideia de que a imunogenicidade de células-tronco, ainda que heterólogas, é limitada (KLYUSHNENKOVA et al., 2005), não se conhecem totalmente os mecanismos celulares relacionados à evasão da resposta imune inata por estas células no organismo receptor. Outro ponto obscuro é saber se a terapia prolongada com CTA alogênicas poderia incitar uma resposta imune mais especializada contra estas células, como seria de se esperar, considerando-as como simples antígenos não-próprios a serem reconhecidos por células de memória.

Diferentemente das CTE, as CTA podem ser isoladas a qualquer momento da vida de um indivíduo, o que facilita a terapia autóloga dos pacientes, já que não é necessário que se tenha tido acesso às suas CTE (ENGLISH et al., 2007). Uma fonte de CTA que vem ganhando destaque é o tecido adiposo. Há facilidade de obtenção de reservas orgânicas de tecido adiposo, com procedimentos pouco invasivos e, inclusive, com potenciais benefícios ao paciente no caso de lipoaspiração de gordura excessiva. Além disso, a grande quantidade de tecido adiposo disponível em reservas subcutâneas, por exemplo, conta a favor da terapia com CTDA. Nesse caso, a terapia autóloga fica na dependência da expansão da população de CDTA *in vitro*. Por outro lado, essas características diminuem os potenciais danos ao doador para obtenção de células alogênicas, podendo se considerar a formação de bancos de CTDA.

#### 2.1.4 Transplante de células derivadas da medula óssea

Entre as populações de CTA mais amplamente estudadas e aplicadas na clínica médica e veterinária estão as derivadas da medula óssea. Entre essas populações celulares incluem-se as CTM, também conhecidas como células do estroma da medula óssea (CEMO) e as CTHMO. As CTHMO têm sido aplicadas com sucesso para o transplante autólogo e alogênico de medula óssea (MORRISON; SCADDEN, 2014). Além disso, as células da fração mononuclear da medula óssea (CFMO), em que se incluem as CTM, as CTHMO e células hematopoiéticas em diferentes estágios de diferenciação, tem sido utilizadas para fins terapêuticos, especialmente com o objetivo de promover revascularização - por contarem com progenitores endoteliais - tanto no músculo cardíaco como no esquelético (HIGASHI et al., 2004; SEEGER et al., 2007; TATEISHI-YUYAMA et al., 2002).



Um dos obstáculos para a utilização de CTA, como as CTHMO, é a dificuldade de obtenção de altas concentrações de células. Isso ocorre devido ao menor número de CTA presentes no organismo em comparação à abundância de outros tipos de células somáticas. No caso das CTHMO, sua proporção fica em torno de 1:10000 entre o total de células da medula óssea (BONGSO; RICHARDS, 2004; SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001; TATAISHI-YUYAMA et al, 2002). Contudo, o grande interesse na utilização dessas células com finalidade terapêutica levou ao desenvolvimento de métodos que facilitam o acesso e o isolamento (purificação) de CTHMO. Além de serem obtidas a partir da medula óssea, as CTHMO podem ser isoladas do sangue periférico. As técnicas de coleta de CTHMO a partir do sangue periférico são menos invasivas do que a coleta de medula óssea e, portanto, favorecem sua aplicabilidade em humanos (INABA; EGASHIRA; KOMORI, 2002).

É importante destacar que as células derivadas do estroma mesenquimal da medula óssea e as derivadas do tecido adiposo (ambas culturas expandidas *in vitro*), ou as células da fração mononuclear da medula óssea (separadas por gradiente de densidade), obviamente, constituem três populações distintas. Isso, por si, é motivo para que a viabilidade e a distribuição dessas células, quando aplicadas no organismo receptor, não sejam equivalentes. Outro aspecto digno de nota é que tem se demonstrado que receptores (machos ou fêmeas) de células-tronco derivadas de doadoras fêmeas têm maior risco de rejeição ao transplante do que aqueles que recebem células de doadores machos (GRATWOHL et al., 2001; VERDIJK et al, 2004). Como um possível mecanismo relacionado a essa característica, Verdijk et al. (2004) demonstraram maior potencial de indução de resposta imune contra células derivadas de doadoras que tenham passado por gestação, o que decorreria da indução de resposta por células T citotóxicas contra antígenos originários do(s) pai(s) do(s) feto(s).

As terapias com CTA têm sido empregadas no tratamento de variados tipos de lesões cujo mecanismo esteja relacionado a agentes da resposta imunológica (BUNNELL et al., 2010; RASMUSSEN, 2006). Tem-se demonstrado, nesse sentido, um forte componente de regulação da resposta inflamatória, o qual resulta da ação direta ou indireta dessas células, seja por sinalização parácrina ou, possivelmente, por estímulo à sinalização endócrina.

## **2.2 A toxoplasmose na saúde humana e animal**

### **2.2.1 Biologia da toxoplasmose: uma zoonose oportunista**

A toxoplasmose é uma zoonose provocada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* do filo Apicomplexa, de caráter altamente infeccioso e de grande impacto

à saúde pública (ROBERTS et al., 1990). O referido parasito é capaz de infectar qualquer espécie animal de sangue quente e apresenta extensa distribuição ao redor do mundo (INNES, 1997).

Na fase aguda da infecção, os taquizoítos (forma de multiplicação rápida) do protozoário se disseminam pelo organismo provocando destruição das células infectadas e lesão inflamatória (GADDI; YAP, 2007). Na fase crônica, o protozoário se evade à resposta imune do hospedeiro, formando cistos teciduais de bradizoítos (forma de semilatência), os quais se localizam, preferencialmente, em sítios de privilégio imunológico, como sistema nervoso central, olho e tecidos da placenta e do feto (origem dos casos de transmissão vertical pela rota transplacentária). Os cistos teciduais mantêm o hospedeiro como portador crônico do protozoário (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; RANDALL; HUNTER, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Estima-se que um terço da população humana seja de portadores do parasito (INNES, 2010; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A toxoplasmose é, geralmente, assintomática. Contudo, pode causar desde sinais clínicos leves e inespecíficos até cegueira, encefalopatia, doenças mentais e morte (DUBEY; JONES, 2008; FLEGR; STRIZ, 2011; INNES 2010). Quando acomete mulheres gestantes a toxoplasmose pode levar a abortos, malformações fetais e retardo mental do neonato (HOHLFELD et al., 1989; WALLON et al., 1999).

Após o nascimento, a infecção persistente por *T. gondii* pode causar diversos graus de lesões oculares, variando desde perdas menos significativas da visão até à cegueira (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002) e sintomas de caráter neurológico, incluindo demência e esquizofrenia (HABEK et al., 2009; TORREY; BARTKO; YOLKEN, 2012; VIDAL et al., 2005). A toxoplasmose congênita, muitas vezes, se manifesta durante a infância e a adolescência (BOYER et al., 2005). O curso clínico da doença tende a ser mais grave, com risco de óbito, em pessoas com alguma deficiência imunológica transitória ou permanente (VIDAL et al., 2005).

Em animais domésticos, a toxoplasmose provoca grandes prejuízos à ovinocultura ao redor do mundo. Estas perdas decorrem principalmente de mortalidade fetal, abortos, natimortos ou nascimento de cordeiros inviáveis, paridos por ovelhas infectadas (BUXTON et al., 2007; DUBEY, 2009). Os gatos domésticos e silvestres são os hospedeiros definitivos de *T. gondii* (INNES, 1997) e os principais responsáveis pela infecção dos humanos e de outras espécies de hospedeiros intermediários.

A infecção horizontal dos hospedeiros intermediários, em geral, ocorre pela ingestão de oocistos do protozoário, que são eliminados nas fezes dos gatos, e acabam por contaminar alimentos ou a água de consumo humano ou animal (INNES, 1997; KAPPERUD et al., 1996). Outra forma de infecção horizontal, tanto para os hospedeiros intermediários como para os definitivos, é a ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados - contendo taquizoítos ou cistos teciduais de bradizoítos - como a ovina, a bovina, a suína ou a de animais silvestres (BUXTON et al., 2007; DUBEY, 2009; KAPPERUD et al., 1996).

### 2.2.2 A toxoplasmose em pacientes de transplantes alogênicos

O sucesso dos transplantes de células alogênicas, como no caso da terapia celular com CTHMO ou CFMO, em geral, depende de um adequado regime de condicionamento prévio ao transplante (pré-condicionamento). Esse procedimento pode ser farmacológico e deve levar à imunossupressão do paciente. A imunossupressão farmacológica pode perdurar, após o transplante, como terapia contra os mecanismos fisiológicos de rejeição às células alogênicas. Esse conjunto de ações faz com que diminuam os riscos de rejeição e aumente a possibilidade de enxertia das células transplantadas (CANER et al., 2012).

A toxoplasmose representa um sério risco aos pacientes de transplante alogênico mantidos sob terapia imunossupressora. Isso porque a imunossupressão predispõe à reativação de infecção pré-existente e suprime a capacidade de resposta do paciente à primoinfecção, diante da possibilidade de transmissão de *T. gondii* a partir do ambiente ou de células de doadores infectados (CHANDRASEKAR; MOMIN, 1997).

A transmissão de *T. gondii* em decorrência da transfusão de leucócitos de doadores infectados para pacientes soronegativos foi reportada por Siegel et al. (1971). Alguns anos mais tarde, RYNING et al. (1979) apresentaram evidências que apontavam para a transmissão de *T. gondii* em dois casos clínicos, nos quais pacientes soronegativos receberam coração de doadores soropositivos acometidos por infecção recente. Desde então, outros casos de toxoplasmose transmitida de doadores infectados crônica ou recentemente para receptores soronegativos vêm sendo reportados (DEROUIN; PELLOUX, 2008; MARTINO et al., 2000).

Contudo, deve-se considerar que o principal fator de risco presente nesse contexto é a imunossupressão decorrente do pré-condicionamento. Assim, o fato do paciente ser portador de toxoplasmose (em humanos ou animais) e ser submetido a um regime de imunossupressão com quimioterápicos, por exemplo, pode determinar um alto risco de reativação e disseminação de taquizoítos pelo organismo. Os casos clínicos relatados de toxoplasmose

sistêmica sob terapia de imunossupressão prévia e/ou posterior ao transplante alogênico têm ocorrido principalmente em transplantes de medula óssea, e têm resultado em altos índices de mortalidade (CIBICKOVA et al., 2007; DEROUIN; PELLOUX, 2008; MARTINO et al., 2000; MEDEIROS et al., 2001; ROEMER et al., 2001).

Enquanto a hipersensibilidade e a forte resposta inflamatória ao protozoário são os mecanismos envolvidos na patogenia da toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes; nos casos de imunodeficiência, a disseminação de taquizoítos e a lise das células infectadas representam o principal mecanismo de destruição e lesão dos tecidos (GADDI; YAP, 2007).

Quando se utilizam CTA na terapia celular, como resultados, se esperam a diminuição na extensão de lesões e a reparação mais rápida de tecidos lesionados. Esses mecanismos podem ser induzidos por ação direta ou indireta das células-tronco na regeneração tecidual, inclusive no sistema nervoso central (SHICHINOHE et al., 2010). Este tipo de efeito poderia ser benéfico no tratamento de lesões celulares e inflamatórias causadas pela disseminação e multiplicação de taquizoítos intracelulares e na toxoplasmose cerebral.

A natureza do estímulo antigênico influencia no balanço de quais citocinas serão produzidas e que tipos de eventos as mesmas irão estimular ou inibir. A regulação desses múltiplos fatores produzidos em “cascata” determina se haverá predominância de mecanismos mediados por anticorpos (e por qual classe de anticorpos) ou mediados por células (e por quais classes de células). As células alogênicas transplantadas têm influência na resposta imune do indivíduo que as recebe, seja atuando como antígenos (principalmente na resposta inespecífica sistêmica), seja em decorrência de sua potencial ação parácrina (ou sinalização endócrina) via citocinas que liberam, estimulam ou inibem (SHI et al., 2010). Essas características indicam a possibilidade de que a terapia celular interaja com a resposta imunológica e/ou a homeostase e reparação das lesões provocadas pela infecção por *T. gondii*.

O transplante de diferentes tipos de células alogênicas, incluindo células-tronco, vem se consolidando como alternativa terapêutica para animais e humanos. As controvérsias vigentes indicam que a ampliação dos estudos nessa área é necessária para que a comunidade científica possa exercer um juízo de valor mais acurado quanto à segurança e à eficácia da terapia celular, ponderando benefícios e riscos. Apesar de parecer um pensamento retrógrado em tempos de certa exaltação midiática das células-tronco, a cautela em relação à sua aplicabilidade terapêutica ainda deve prevalecer. Nesse sentido, os modelos animais são essenciais ao avanço do conhecimento científico relacionado à terapia celular.

### **3. CAPÍTULO 1 – Artigo aceito para publicação na revista *Ciência Rural*.**

#### **NESTED-PCR MULTIPLEX TEST WITH INCREASED SENSITIVITY FOR DETECTION OF ALLOGENEIC CELLS TRANSPLANTED FROM MALE TO FEMALE MICE**

##### ***Nested-PCR multiplex* com aumento da sensibilidade de detecção de células alogênicas transplantadas de camundongos machos para fêmeas**

Alfredo Skrebsky Cezar<sup>1\*</sup>, Werner Giehl Glanzner<sup>1</sup>, Karina Gutierrez<sup>1</sup>, Paulo Afonso Anezi-Junior<sup>1</sup>, Carlise Reichert Nilles<sup>1</sup>, Fábio Vasconcellos Comim<sup>2</sup>, Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>3</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>1</sup>

#### **ABSTRACT**

Cell therapy has shown encouraging perspectives for human and veterinary medicine. Experimentally, genetic manipulation allows to mark and locate allogeneic cells. However, this makes their genotype/phenotype different from non-marked cells used clinically. Alternatively, the presence of the Y-chromosome enables male donor cells detection in female organisms. However, the concentration of engrafted cells may be minimal in tissues, due to systemic distribution. In this study, a nested-PCR multiplex test was developed, aiming to increase the sensitivity of the presence/absence diagnosis of male mice adipose-derived (ADSC-Y) and bone marrow mononuclear (BMNC-Y) cells in samples of blood and lungs from females, after endovenous transplantation. Four females received placebos; four females received ADSC-Y from two males; and four females received BMNC-Y from two males. The PCR first-step included two primer sets (multiplex): one for amplification of a Y-chromosome fragment (SRYout; 300bp); the other for amplification of an X-chromosome (DXNds3 gene) fragment. In the PCR second-step, one primer set (SRYinn) was used for amplification of a 110bp fragment, restrained in the SRYout amplification product. The PCR internal control

---

<sup>1</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), 97105-900, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: [alfredosps@hotmail.com](mailto:alfredosps@hotmail.com). \*Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, UFSM, BioRep, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

(DXNds3 gene) was detected in all DNA samples, whereas the SRY gene external fragment (300bp) was detected exclusively in ADSC-Y and BMNC-Y pure DNA samples. The SRY gene internal fragment (110bp) was detected in 100% of the blood and lung samples from the ADSC-Y and BMNC-Y female recipients. The nested-PCR technique increased sensitivity and reliability for molecular diagnostic of presence or absence of male mice cells in body fluids and tissues of female recipients after endovenous transplantation.

**Key words:** cellular therapy, transplantation, allogeneic cells, diagnosis, Y-chromosome.

## RESUMO

A terapia celular traz perspectivas encorajadoras à medicina humana e veterinária. Experimentalmente, a manipulação genética permite a marcação e a localização de células alogênicas. Porém, isso torna seu genótipo/fenótipo diferente daquelas usadas clinicamente, sem marcação. Alternativamente, a presença do cromossomo Y possibilita detectar células de doadores machos no organismo de fêmeas. Todavia, a concentração de células transplantadas pode ser mínima em certos tecidos, pela distribuição sistêmica. Neste estudo, foi desenvolvida uma *nested-PCR multiplex*, visando a aumentar a sensibilidade do diagnóstico de presença/ausência de células derivadas do tecido adiposo (CDTA-Y) e derivadas da fração mononuclear da medula óssea (CFMO-Y) de camundongos machos, em amostras de sangue e de pulmões de camundongos fêmeas, após transplante endovenoso. Quatro fêmeas receberam placebo; quatro fêmeas receberam CDTA-Y de dois machos; e quatro fêmeas receberam CFMO-Y de dois machos. A primeira fase da PCR teve dois pares de *primers (multiplex)*: um para amplificação de fragmento do cromossomo Y (SRYout; 300pb); outro para amplificação de fragmento do cromossomo X (gene DXNds3). Na segunda fase da PCR, foi usado um par de *primers* para amplificação de fragmento de 110pb (SRYinn) interno ao produto amplificado pelo SRYout. O controle interno da reação (gene DXNds3) foi detectado em todas as amostras de DNA testadas, enquanto que o fragmento externo do gene SRY (300pb) foi detectado apenas nas amostras puras de DNA de CDTA-Y e CFMO-Y. O fragmento interno do gene SRY (110pb) foi detectado no sangue e nos pulmões de 100% das receptoras de CDTA-Y e CFMO-Y. A técnica de *nested-PCR* aumentou a sensibilidade e a segurança do diagnóstico molecular de presença ou ausência de células de camundongos machos em fluidos e tecidos de receptoras fêmeas após transplante endovenoso.

**Palavras-chave:** terapia celular, transplante, células alogênicas, diagnóstico, cromossomo Y.

## INTRODUCTION

Cell therapy continues to evolve as one of the most promising frontiers of scientific knowledge applied to human and veterinary health (FORTIER & TRAVIS, 2011; OTSURU et al., 2012; TABAR & STUDER, 2014). However, its efficacy and safety are not fully established either for animals or humans, in view of the risks concerning tumor induction and transplantation rejection (DJOUAD et al., 2003; KRSTEVSKA et al., 2011). The cell therapy has been tested for several purposes such as: repair and functional regeneration of organs as heart, lungs, liver, kidneys and skin; bone tissue remodeling; bone marrow transplantation and bone marrow cancer therapy; treatment of degenerative neurological diseases; and treatment against autoimmunity and graft-versus-host disease, among others (BARRY & MURPHY, 2004; LAU et al., 2009; LINDVALL & KOKAIA, 2010; FORTIER & TRAVIS, 2011; MIELCAREK et al., 2012; ZANETTI et al., 2013). The allogeneic cells can be administered systemically or locally, by injection, infusion or controlled releasing systems of the cells or their chemical messengers (SHIM et al., 2013; LIU et al., 2014).

Cell therapy can act by paracrine or systemic signaling, and has been used to modulate immune response and promote cellular differentiation, depending on the cell type (BARRY & MURPHY, 2004). The pattern of distribution of the allogeneic cells throughout the recipient organism depends on such factors as the cell type, administration route and the immune response to transplantation (GAO et al., 2001; LIAO et al., 2008; LINDVALL & KOKAIA, 2010). Molecular or histological detection of allogeneic cells in body fluids and tissues from recipients demonstrates the organic distribution of these cells after transplantation, whereas their effect may be related to the clinical course of the disease. However, this also depends on the interaction of other factors inherent to the environment, the patient and the disease etiology. Therefore, knowing the fate of transplanted allogeneic cells is essential for understanding their function, which may be due to the allogeneic cells' location in the tissues or due to mediators secreted by these cells.

In general, genetically manipulated cells are used to allow detection of these cells after experimental transplantation (LIAO et al., 2008; OTSURU et al., 2012). However, this kind of manipulation of the cell population is not desirable in clinical trials, as the genotype/phenotype of the marked cells is different from non-marked cells. Consequently, the effects of the therapy and risk factors previously verified with genetically manipulated cells may be not repeatable in clinical therapy with non-marked cells.

Detection of specific DNA fragments of the Y-chromosome can be used to localize cells from a male donor into female recipient tissue (WULF et al., 2003; TAKEHARA et al., 2013; LIU et al., 2014). However, detection sensitivity is a key-factor in these cases, since the concentration of allogeneic cells may be minimal in the blood and tissue samples from recipients, due to a broad systemic distribution after transplantation (GAO et al., 2001; LIAO et al., 2008). In a single-step PCR, one pair of primers is used for exponential amplification of the targeted DNA fragment (amplicon). Thus, in a second-step reaction with another specific pair of primers (nested-PCR), an internal sequence of DNA restrained in the first-step amplicon can be exponentially amplified. This step increases the sensitivity of molecular detection due to the increased number of the targeted DNA fragment copies. Besides, the internal fragment amplification depends on the complementarities between primers and DNA sequences in the two steps of the nested-PCR, thus increasing the specificity of molecular diagnosis (KUNIEDA et al., 1992).

The aim of this study was to develop a nested-PCR test to improve the certainty of the diagnosis for presence/absence of allogeneic DNA in the blood and tissue of recipients, after male-female transplantation of adipose-derived (ADSC-Y) and bone marrow mononuclear-derived (BMNC-Y) cells. An additional detection of a DNA fragment belonging to the X-chromosome was included as an internal control of viability of each sample in the first step of the PCR (multiplex), constituting a nested-PCR with the first-step multiplex.

## **MATERIAL AND METHODS**

The products used were provided by Sigma-Aldrich, USA, except where explicitly mentioned.

### **Animals, procedures and facilities**

The adult eight weeks old Balb/c mice used, four male donors and 12 female recipients, were kept in controlled environmental conditions throughout the experimental period. Euthanasia of donors and recipients and cell therapy procedures described below were done according to the regulations of the CONCEA, Brazil.



### **Adipose-derived cells from male donors (ADSC-Y)**

The ADSC-Y were isolated from adipose tissue of the inguinal region from two male donors, after euthanasia. Tissue samples were washed with PBS, digested with 1 mg ml<sup>-1</sup> type II collagenase in PBS solution (37°C; 30min) and centrifuged (800g; 10min). The pellet was resuspended in DMEM-F12 and the cells were cultured in cell culture flasks (TPP, Switzerland) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity, with DMEM-F12 supplemented with 10% bovine fetal serum (Invitrogen, Brazil), penicillin (100 UI ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100µg ml<sup>-1</sup>) and amphotericin B (0.25µg ml<sup>-1</sup>). The first medium change was performed at 72h after culture, removing non-adherent cells from the culture surface. Cell passages were performed when the culture confluence was 80-90%, using 0.25% trypsin solution diluted in Hank's Balanced Salt Solution.

ADSC-Y were characterized by adhesion to culture surface, morphology and osteogenic differentiation (LIAO et al., 2008). A portion of the fourth-passage cells was submitted to an osteogenic differentiation protocol. Another portion was suspended with 0.25% trypsin, diluted in DMEM-F12 and prepared for transplantation, at a dose based on viable cells counting in Neubauer's chamber (aliquot diluted 1:1 with 0.4% Trypan Blue solution). An aliquot of ADSC-Y was stored at -80°C prior to DNA extraction.

### **Osteogenic differentiation of the ADSC-Y**

Fourth-passage ADSC-Y were plated in six-well dishes, at a concentration of 5,000 cells cm<sup>-2</sup> (or 1x10<sup>5</sup> cells/well), and cultured without passages for 21 days. In three of these wells, cells were cultured with complete DMEM-F12 (control), and in the other three wells, with complete DMEM-F12 supplemented with osteogenic inductive factors (differentiation medium). Both culture mediums were renewed every 72h. The differentiation medium contained ascorbic acid (5µg ml<sup>-1</sup>), β-glycerophosphate (10mM) and dexamethasone (10nM). At 21 days, each well was washed with PBS and the cell monolayer was fixed with 4% paraformaldehyde for 20min at room temperature, followed by washing with deionized water and incubation with 2% Alizarin Red dye at pH 4.1 in aqueous solution for 5min, finishing with five washings with deionized water and evaluation of the calcium matrix deposition (MEIRELLES & NARDI, 2003; LIAO et al., 2008).

### **Bone marrow-derived mononuclear cells from male donors (BMNC-Y)**

The BMNC-Y were harvested from two donors euthanized at transplantation day. Femurs and tibiae were isolated and their extremities were cut for bone-marrow collection as described by TROPEL et al. (2004). Briefly, DMEM-F12 was injected using a 1ml syringe with 25G needle attached to the marrow cavity, exerting pressure for bone-marrow removal embedded in culture medium. Subsequently, harvested bone-marrow cells were resuspended by repeated pipetting and were centrifuged for 30min at 400g in Ficoll-Paque™ PREMIUM gradient with density of  $1.077\pm 0.001\text{g ml}^{-1}$  (GE Healthcare, Sweden). The mononuclear cells fraction, separated by density, was recovered, washed twice in PBS (two cycles of resuspension and centrifugation at 400g for 5min), resuspended in 2ml of DMEM-F12 and prepared for transplantation, at a dose based on viable cells counting, as described above for ADSC-Y. An aliquot of BMNC-Y was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to DNA extraction.

### **Experimental design**

The females were separated into three groups with four animals in each: group 1. 100 $\mu\text{l}$  of DMEM-F12 endovenous (e.v.; placebo); group 2.  $1\times 10^5$  ADSC-Y diluted in 100 $\mu\text{l}$  of DMEM-F12 (e.v.); group 3.  $1\times 10^5$  BMNC-Y diluted in 100 $\mu\text{l}$  of DMEM-F12 (e.v.). Approximate cell viabilities of ADSC-Y and BMNC-Y injected were 97% and 92%, respectively. The doses of the cells injected were adjusted to  $1\times 10^5$  viable cells per recipient. Each female received the cell transplantation (or placebo) by injection in the caudal vein, using 1ml syringe and 25G needle.

Four days after the injection of allogeneic cells, which was considered as sufficient time for the distribution of these cells in the recipient organism (GAO et al., 2001), each female was anesthetized by isoflurane inhalation (Virbac, Brazil) and a sample of 300 $\mu\text{l}$  of blood was collected by submandibular puncture. This was followed by euthanasia by anesthetic deepening and cervical dislocation. Since transplanted cells could be located in lungs (GAO et al., 2001; LIAO et al, 2008), besides blood sampling, a piece of approximately 15mg was collected from a random region of the lungs from each female. Thus, reliability of the nested-PCR multiplex technique could be evaluated in body fluids and organs samples. The samples of blood and lungs were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to DNA extraction by the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Each lung sample was cut, macerated and

homogenized on sterile polystyrene plate (Corning, USA), using scalpel blade (Advantive, China) and serological tip (Bio-Centrix, USA) following the DNA extraction protocol.

### **Allogeneic cells DNA detection**

The first-step of the PCR was multiplex, using 50ng of DNA template with a ratio of absorbance  $\geq 1.7$  (260/280nm) measured by NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). At this step, two pairs of primers were used: one to amplify a fragment of DXNds3 gene, a polymorphic microsatellite in Balb/c (244/270bp; forward: 5'GAGTGCCTCATCTATACTTACAG3'; reverse: 5'TCTAGTTCATTGTTGATTAGTTGC3'; KUNIEDA et al., 1992), which allows the evaluation of DNA template viability in the first electrophoretic run; and another (SRYout), designed to amplify the external fragment (300bp) of the SRY gene ENSMUSG00000069036; (forward: 5'CGCCCCATGAATGCATTTAT3'; reverse: 5'CCTGTCCCCTACTGCAGAAGGT3'), being accepted that this fragment does not appear at the first electrophoretic analysis, considering that a low concentration of allogeneic cells may be present in the samples of blood and lungs from recipients.

The second-step of the PCR was performed using the first-step generated amplicon as DNA template and one pair of primers (SRYinn; forward: 5'GAAAAGCCTTACAGAAGCCGAAA3'; reverse: 5'CCCTCCGATGAGGCTGATATT3'), designed to amplify a 110bp (internal) fragment, restrained in the 300bp (external) fragment amplified in the first-step reaction. SRYout and SRYinn were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, USA) and all the primers used were synthesized by IDT, Brazil.

Each nested-PCR step was performed using 2 $\mu$ l of DNA sample (initial concentration of 50ng), 200nM of each pair of primers and 2.5U of the enzyme Platinum<sup>®</sup> TaqDNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) in a total mix volume of 25 $\mu$ l. The mix was submitted to 40 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 60s and 72°C for 2min, in a PTC 100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (MJ Research, USA). Genomic DNA samples from pure populations of ADSC-Y and BMNC-Y were used as positive controls and deionized water was used as a negative control. The amplified products resulting from each PCR step were analyzed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel stained with silver nitrate for DNA bands visualization.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1A and 1B show the undifferentiated and differentiated ADSC-Y monolayers, respectively. Adherence and morphology of ADSC-Y in culture, besides calcium deposition after induction of osteogenic differentiation, were compatible with adipose-derived mesenchymal cells (LIAO et al., 2008).

Figures 1C and 1D show the main results observed by electrophoresis after the first and second steps of PCR, respectively. The DXNds3 gene, belonging to the X-chromosome, was detected in 100% of the DNA samples (groups 1, 2 and 3 and both ADSC-Y and BMNC-Y positive controls). This amplification (244/270bp; Figure 1C) ensures the viability of the DNA template and confirmed the appropriate conditions for the PCR, acting as an internal control for each sample. Therefore, amplification of DXNds3 gene fragment (244/270bp) was tested in the first step of the PCR (multiplex), along with SRYout.

The 300bp fragment (amplified by SRYout) appeared exclusively in positive controls (Figure 1C), which contained DNA extracted from pure populations of ADSC-Y and BMNC-Y. Despite this, SRY gene was present in 100% of the blood and lung samples from females which received ADSC-Y (group 2) or BMNC-Y (group 3), as proven by visualization of the internal fragment (110bp) by electrophoretic analysis after the PCR second-step (Figure 1D).

The results showed that both the sensitivity and specificity of the PCR first-step were 100% reliable, considering only the positive and negative controls, and all the samples from group 1 (placebo). However, comparing the electrophoretic analysis of the first- and second-step PCR, it was evident that the results were false-negative for the presence of SRY gene in samples from groups 2 and 3 in the first-step reaction. This was probably due to the low concentration of allogeneic DNA in proportion to the total genomic DNA extracted from each sample of blood and lung. Thus, the first-step PCR was inefficient for molecular diagnosis of allogeneic cells distribution after transplantation, justifying the use of a nested-PCR.

In this study, a low concentration of  $1 \times 10^5$  allogeneic cells in single dose was systemically transplanted into each recipient. If higher doses and/or other routes of administration are used, allogeneic cells may be present at higher concentration in the body fluids and tissues of recipients. Therefore, these cells could be detectable by single-step PCR as showed by LIU et al. (2014). However, the results of the present study clearly showed that nested-PCR can provide molecular detection of allogeneic cells at low concentrations, in samples which would be considered negative using a single-step PCR.

A highly sensitive molecular diagnosis is beneficial for *in vivo* studies in humans or animals, since it allows the use of smaller samples for DNA extraction, which diminishes risks to the patients, facilitates collections by biopsies and enables a higher frequency of sampling without euthanasia in animal models (WULF et al., 2003; MEYERROSE et al., 2007; LIU et al., 2014). Along with the increased sensitivity provided by the PCR second-step, the internal control of samples viability included in the PCR first-step (DXNds3 gene), improved the confidence of the diagnosis of the presence or absence of allogeneic cells DNA.

Other techniques may be used in order to increase the sensitivity and assuredness of molecular diagnostic, such as real-time qPCR, especially with specific probes (IMBERTI et al., 2011). However, expensive reagents and specific thermal cyclers are required for qPCR. Moreover, except for one pair of primers (internal), the nested-PCR does not require any type of reagent or equipment besides those used to single-step PCR. Furthermore, the second-step reaction is dispensable for the samples in which the gene of interest (SRY) is detected in the PCR first-step, diminishing the final cost of diagnosis. All these features accredit the nested-PCR as an extremely reliable technique, which is affordable to most research laboratories.

In turn, *in situ* hybridization may be used for elucidating the structural location of allogeneic cells in tissue samples. However, this technique is laborious, requires histological preparation and may be less sensitive for low concentrations of allogeneic cells (TAKEHARA et al., 2013). On account of this, even when the location of allogeneic cells into tissues is desired, a preliminary mapping of their distribution in the recipient organism is recommended. In these cases, a screening by nested-PCR can be used to avoid unnecessary processing of samples from negative tissues by *in situ* hybridization.

The nested-PCR test can be used to monitor the fate of allogeneic transplanted cells into recipient organism, without cell labeling by genetic manipulation. Therefore, nested-PCR test is adequate for experimental or clinical purposes. The presence/absence diagnosis shows the organs to which transplanted cells have spread (or not) and settled (or not) and can be done at several sampling points over time elapsed from transplantation. Although molecular detection of the SRY gene has been designed exclusively for male-female transplants, it is important to note that the incidence of chronic graft-versus-host disease is lower in transplants involving male donors (GRATWOHL et al., 2001; VERDIJK et al., 2004).

In this study, ADSC-Y were transplanted after four passages in culture and BMNC-Y were transplanted soon after collection, consisting of very different cell populations regarding their original niche and characteristics (LIAO et al., 2008; MIELCAREK et al., 2012; OTSURU et al., 2012; TAKEHARA et al., 2013). Since the nested-PCR multiplex described

in this study was reliable for two different populations of allogeneic transplanted cells, this method may be used for other cell types, such as adult or embryonic stem cells.

## CONCLUSION

Both internal control and PCR second-step increased the reliability of the molecular diagnosis for the presence or absence of different types of allogeneic cells in blood and tissues of recipients. The nested-PCR multiplex developed in this study provides a more sensitive evaluation of the organic distribution of male-derived cells in body fluids and tissues of female recipients in comparison to single-step PCR.

**ETHICS COMMITTEE:** Procedures involving animals were performed in accordance to CEUA-UFSM (registration number: 095/2011).

**ACKNOWLEDGEMENTS:** Authors acknowledge financial support from CAPES scholarship and CNPq/FAPERGS (PRONEX - process number 10/0039-3- edital 008/2009).

## REFERENCES

- BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.4, p.568-584, 2004. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>>. Accessed: Feb. 01, 2014. doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.001.
- DJOUAD, F. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**, v.102, n.10, p.3837-3844, 2003. Available from: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/102/10/3837.full>>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1182/blood-2003-04-1193.
- FORTIER, L.A.; TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Res Ther**, v.2, n.9, p.1-6, 2011. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092149/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092149/)>. Accessed: Feb. 02, 2014. doi: 10.1186/srct50.
- GAO, J. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v.169, n.1, p.12-20, 2001. Available from: <[www.karger.com/Article/Fulltext/47856](http://www.karger.com/Article/Fulltext/47856)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1159/000047856.

- GRATWOHL, A. et al. Female donors influence transplant-related mortality and relapse incidence in male recipients of sibling blood and marrow transplants. **Hematol J**, v.2, n.6, p.363-370, 2001. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920275](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920275)>. Accessed: Jan. 13, 2014. doi: 10.1038/sj.thj.6200117.
- IMBERTI, B. et al. Embryonic stem cells, derived either after in vitro fertilization or nuclear transfer, prolong survival of semiallogeneic heart transplants. **J Immunol**, v.186, n.7, p.4164-4174, 2011. Available from: <[www.jimmunol.org/content/186/7/4164.full](http://www.jimmunol.org/content/186/7/4164.full)>. Accessed: Feb. 14, 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1000654.
- KRSTEVSKA, A., et al. Acute graft versus host disease in hematopoietic stem cell allotransplant recipients. **Med Arh**, v.65, n.5, p.196-198, 2011. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073847](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073847)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.5455/medarh.2011.65.196-198.
- KUNIEDA, T. et al. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. **Biol Reprod**, v.46, n.4, p.692-697, 1992. Available from: <[www.biolreprod.org/content/46/4/692.full.pdf+html](http://www.biolreprod.org/content/46/4/692.full.pdf+html)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1095/biolreprod46.4.692.
- LAU, K. et al. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. **Exp Dermatol**, v.18, n.11, p.921-933, 2009. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719838)>. Accessed: Feb. 10, 2014. doi: 10.1111/j.1600-625.2009.00942.x.
- LIAO, X. et al. Distribution of murine adipose-derived mesenchymal stem cells in vivo following transplantation in developing mice. **Stem Cells Dev**, v.17, n.2, p.303-314, 2008. Available from: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/scd.2007.0086>>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1089/scd.2007.0086.
- LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders - time for clinical translation? **J Clin Invest**, v.120, n.1, p.29-40, 2010. Available from: <[www.jci.org/articles/view/40543](http://www.jci.org/articles/view/40543)>. Accessed: Feb. 10, 2014. doi: 10.1172/JCI40543.
- LIU, X. et al. Mesenchymal stem cells systemically injected into femoral marrow of dogs home to mandibular defects to enhance new bone formation. **Tissue Eng Part A**, v.20, n.3-4, p.883-892, 2014. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125551](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125551)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0677.
- MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Br J Haematol**, v.123, n.4, p.702-711, 2003. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.2003.04669.x/full>>. Accessed: Apr. 10, 2012. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04669.x.

- MEYERROSE, T.E. et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. **Stem Cells**, v.25, n.1, p.220-227, 2007. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2006-0243/full>>. Accessed: Feb. 14, 2014. doi: 10.1634/stemcells.2006-0243.
- MIELCAREK, M. et al. Long-term outcomes after transplantation of HLA-identical related G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow. **Blood**, v.119, n.11, p.2675-2678, 2012. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308289](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308289)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1182/blood-2011-12-396275.
- OTSURU, S. et al. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. **Blood**, v.120, n.9, p.1933-1941, 2012. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433095](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433095)>. Accessed: Feb. 04, 2014. doi: 10.1182/blood-2011-12-400085.
- SHIM, W. et al. Critical path in cardiac stem cell therapy: an update on cell delivery. **Cytherapy**, v.15, n.4, p.399-415, 2013. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294824](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294824)>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.003.
- TABAR, V.; STUDER, L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. **Nat Rev Genet**, v.15, n.2, p.82-92, 2014. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434846)>. Accessed: Jan. 20, 2014. doi: 10.1038/nrg3563.
- TAKEHARA, Y. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. **Lab Invest**, v.93, n.2, p.181-193, 2013. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561594)>. Accessed: Feb. 14, 2014. doi: 10.1038/labinvest.2012.167.
- TROPEL, P. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Exp Cell Res**, v.295, n.2, p.395-406, 2004. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.030>>. Accessed: Feb. 12, 2014. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.12.030.
- VERDIJK, R. et al. Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. **Blood**, v.103, p.1961-1964, 2004. Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592836)>. Accessed: Feb. 09, 2014. doi: 10.1182/blood-2003-05-1625.



WULF, G.G. et al. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. **Haematologica**, v.88, n.4, p.368-378, 2003.

Available from: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681963](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681963)>. Accessed: Feb. 14, 2014.

ZANETTI, A.S. Human adipose-derived stem cells and threedimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. **J Biomed Mater Res Part B**, v.101B, n.1, p.187-199, 2013. Available from:

<[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997152](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997152)>. Accessed: Feb. 10, 2014. doi:

10.1002/jbm.b.32817.

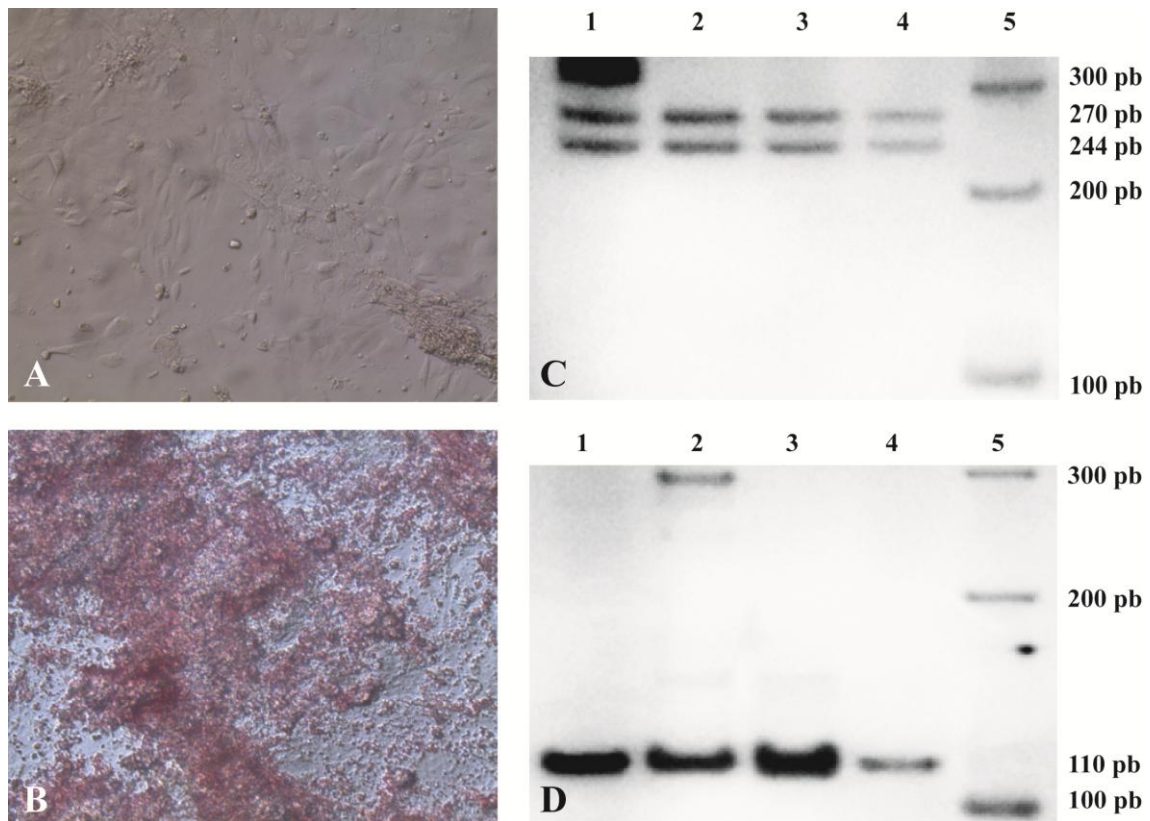


Figure 1 - (A) ADSC-Y cell culture (200x magnification); (B) ADSC-Y after osteogenic differentiation induction (note areas of calcium deposition stained with 2% Alizarin Red; 200x magnification); (C) Electrophoretic analysis after first-step PCR (multiplex): visualization of the external fragment (300bp) from SRY gene in column 1 (DNA from ADSC-Y culture) and visualization of the polymorphic fragment (244/270bp) from DXNds3 gene in columns 1, 2 (ADSC-Y recipient lung), 3 (BMNC-Y recipient lung) and 4 (ADSC-Y recipient blood); (D) Electrophoretic analysis after nested-PCR: visualization of the internal fragment (110bp) from SRY gene in columns 1 (ADSC-Y recipient lung), 2 (DNA from ADSC-Y culture), 3 (BMNC-Y recipient lung), 4 (ADSC-Y recipient blood); visualization of a 300bp fragment remaining from the first-step PCR in column 2 (DNA from ADSC-Y culture). For DNA length estimation, 7 $\mu$ l of 100bp DNA ladder (Amresco, USA) were applied in both columns 5 (Figures 1C and 1D).

#### **4. CAPÍTULO 2 – Artigo científico.**

Este capítulo originou um artigo submetido para publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

### **PRÉ-CONDICIONAMENTO COM BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA E TRANSPLANTE ALOGÊNICO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE *Toxoplasma gondii***

**Conditioning with busulfan and cyclophosphamide and allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in mice chronically infected by *Toxoplasma gondii***

Alfredo Skrebsky Cezar<sup>1</sup>, Werner Giehl Glanzner<sup>1</sup>, Paulo Afonso Anezi-Júnior<sup>1</sup>, Lady Katerine Serrano-Mujica<sup>1</sup>, Giovana Camillo<sup>2</sup>, Fabio Vasconcellos Comim<sup>3</sup>, Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>2</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep).

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR).

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, UFSM, BioRep.

#### **RESUMO**

A toxoplasmose é uma zoonose oportunista de ampla distribuição mundial causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*. Na fase aguda, taquizoítos de *T. gondii* se disseminam pelo organismo, destruindo as células infectadas. Na fase crônica, o parasita se evade à resposta imune ao formar cistos teciduais de bradizoítos, mantendo o hospedeiro como portador crônico, em geral, assintomático. O pré-condicionamento para transplante alogênico é um procedimento usado para imunossupressão deliberada do paciente, visando suprimir a resposta contra as células alogênicas enxertadas. A imunossupressão pode promover a reativação da toxoplasmose, com sérios riscos ao paciente, que terá reduzida capacidade de resposta à infecção. Neste estudo, apresenta-se um modelo de infecção crônica por *T. gondii* em camundongos fêmeas Balb/c (isogênicas) e a avaliação dos efeitos de um protocolo de imunossupressão farmacológica com altas doses de busulfan e ciclofosfamida (PCT), seguido do transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea de

doadores machos. O estudo foi dividido em três etapas subsequentes, utilizando as mesmas fêmeas Balb/c: I. infecção via oral, com 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49), e acompanhamento da evolução clínica da doença; II. imunossupressão farmacológica (pré-condicionamento para o transplante alogênico); III. transplante endovenoso de células alogênicas da fração mononuclear da medula óssea de camundongos machos (células BMy). Foi realizada avaliação diária do quadro clínico dos animais durante todo o período experimental. Nas etapas II e III foram aferidos, diariamente, o peso dos animais e o consumo médio de ração. Cistos de bradizoítos nos tecidos encefálicos foram contados *post-mortem*. A inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* (ME-49) resultou em 100% de morbidade e 24,3% de mortalidade aguda. Observou-se a melhora do quadro clínico após a fase aguda da doença, até o PCT. Durante esse período, não ocorreram sinais clínicos nas fêmeas Balb/c não-infectadas (controle). O PCT causou piora do quadro clínico em animais infectados e controles. Considerando-se escore clínico e período de sobrevivência, esse efeito deletério foi mais precoce nos animais infectados. O transplante de células BMy prolongou levemente o tempo médio de sobrevivência em animais submetidos ao PCT. Contudo, todos os camundongos fêmeas imunossuprimidos morreram em um período de duas semanas. Por outro lado, o transplante de células alogênicas da fração mononuclear da medula óssea (células BMy) foi seguro para as fêmeas Balb/c que não foram submetidas ao PCT, mesmo naquelas cronicamente infectadas por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** toxoplasmose; reativação; cistos teciduais; terapia celular; imunossupressão farmacológica.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a worldwide distributed opportunistic zoonosis caused by the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. During acute infection, *T. gondii* tachyzoites spread in the organism, destroying infected cells. In the chronic infection, parasite evades to immune response forming tissue cysts of bradyzoites, keeping the host as a chronic carrier, generally asymptomatic. Conditioning for allogeneic transplantation is a procedure used for deliberate immunosuppression of the patient, aiming to suppress the response against allogeneic cells grafted. Immunosuppression can promote toxoplasmosis reactivation, with serious risks to the patient, which will have reduced responsiveness to infection. This study presents a model of chronic infection by *T. gondii* in female Balb/c mice (isogenic) and assessment of the effects of a pharmacological immunosuppression protocol with high-doses

of busulfan and cyclophosphamide (PCT), followed by allogeneic transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells from male donors. This study was divided in three subsequent steps using the same female Balb/c: I. oral infection, with 50 tissue cysts of *T. gondii* (ME-49 strain), and monitoring of disease clinical course; II. pharmacological immunosuppression (conditioning for allogeneic transplantation); III. endovenous transplantation of allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells from male mice (BMy cells). Daily assessment of the clinical status of the animals was performed throughout the experimental period. In steps II and III, animals weights and average feed consumption were assessed daily. Encephalic tissue cysts of bradyzoites were counted *post-mortem*. Oral inoculation of 50 tissue cysts of *T. gondii* (ME-49) resulted in 100% morbidity and 24.3% mortality by acute disease. Improvement of the clinical score was observed after the acute phase of the disease, up to PCT. No clinical signs were observed in non-infected (control) female Balb/c. PCT caused worsening of the clinical score in both infected and control animals. Considering clinical score and survival period, such deleterious effect was premature in infected animals. Bmy cells transplantation slightly prolonged the average survival time in animals submitted to PCT. However, all immunosuppressed mice died within two weeks period. On the other hand, transplantation of allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells (BMy cells) was safe to female Balb/c which were not submitted to PCT, even those chronically infected by *T. gondii*.

**Key words:** toxoplasmosis, reactivation, tissue cysts, cell therapy, pharmacological immunosuppression.

## INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, zoonótico e de distribuição mundial. Estima-se que um terço da população humana seja de portadores do parasita (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; INNES, 2010; ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012). As principais rotas de transmissão são a via oral, pela ingestão de oocistos ou cistos teciduais, e a via transplacentária (infecção congênita) (INNES, 2010). A toxoplasmose é, geralmente, assintomática. Contudo, pode causar desde sinais clínicos leves e inespecíficos até aborto, cegueira, encefalopatia, doenças mentais e morte (DUBEY & JONES, 2008; INNES 2010; FLEGR & STRIZ, 2011).

Na infecção aguda, taquizoítos do protozoário se disseminam pelo organismo provocando destruição das células infectadas e lesão inflamatória (GADDI & YAP, 2007). Na

infecção crônica, o protozoário se evade à resposta imune do hospedeiro, formando cistos teciduais de bradizoítos (forma de semilatência), principalmente em sítios de privilégio imunológico, como sistema nervoso central, olho e placenta/feto. Os cistos mantêm o hospedeiro como portador crônico do protozoário (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; RANDALL & HUNTER, 2011; ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012).

Modelos animais são muito úteis no estudo da toxoplasmose. *T. gondii* multiplica-se clonalmente no hospedeiro intermediário, e cada cepa se classifica nos tipos I (de alta virulência), II e III (ambos de baixa virulência), ou em recombinações de dois genótipos (BOOTHROYD & GRIGG, 2002; FUX et al., 2003; SAEIJ et al., 2005). Camundongos Balb/c são pouco susceptíveis a cepas como a ME-49, do tipo II, e VEG, do tipo III, mas altamente susceptíveis à RH, do tipo I (SAEIJ et al., 2005; PEZERICO et al., 2009). Os mecanismos patogênicos de cada cepa e a competência imunológica do hospedeiro refletem no curso clínico da doença (SUZUKI et al., 2000; ROEMER et al., 2001; SAEIJ et al., 2005). Por isso, hospedeiros imunocomprometidos ou sob terapia imunossupressora têm menor capacidade de resposta à infecção primária ou à reativação de *T. gondii* (ROEMER et al., 2001; VIDAL et al., 2005; DEROUIN & PELLOUX, 2008).

A imunossupressão farmacológica é indicada para o pré-condicionamento de pacientes para transplantes alogênicos (NAUTA et al., 2006). Busulfan e ciclofosfamida são alguns dos principais quimioterápicos usados para este fim (BLUME et al., 1993; MEDEIROS et al., 2001; CIBICKOVA et al., 2007; SCOTT et al., 2012). Ao preparar o paciente para receber células alogênicas, diminuindo o risco de rejeição ao transplante, esse procedimento causa imunossupressão generalizada (BLUME et al., 1993; DEEG et al., 2006; ISHIDA et al., 2012). Por isso, a infecção primária ou a reativação da toxoplasmose trazem graves riscos a pacientes de transplantes alogênicos, que se encontram debilitados e sob terapia imunossupressora (ROEMER et al., 2001; DEROUIN & PELLOUX, 2008).

Células da fração mononuclear da medula óssea (CFMO) têm sido usadas para terapia celular em animais e humanos (ROUX et al., 1992; TATEISHI-YUYAMA et al., 2002; SEEGER et al., 2007; MATOBA et al., 2008). Populações de células-tronco, como as mesenquimais (CTM) e as hematopoiéticas (CTHMO), constituem apenas pequenas parcelas das CFMO (SPRADLING et al., 2001; WOGNUM et al., 2003). Por isso, para que se utilizem células-tronco, uma etapa de expansão em cultivo é essencial. Essa etapa não é necessária para CFMO, devido à sua abundância, facilitando o transplante em casos urgentes ou de doença avançada. Além disso, as CFMO apresentam heterogeneidade de tipos celulares, resultando em um repertório potencialmente mais variado de efeitos (SEEGER et al., 2007;

SAMDANI et al., 2009; WRIGHT et al., 2011). Para fins terapêuticos, esses aspectos diferem as CFMO das culturas de células-tronco.

Os objetivos deste estudo foram avaliar: (1) o curso clínico da toxoplasmose em fêmeas Balb/c infectadas com 50 cistos teciduais (cepa ME-49) pela via oral, como modelo experimental de toxoplasmose crônica; (2) o efeito do pré-condicionamento com busulfan + ciclofosfamida (PCT) em Balb/c fêmeas, na presença ou ausência de toxoplasmose crônica; (3) a evolução clínica dessas fêmeas após transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea de doadores machos (BMy).

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi constituído de três etapas subsequentes. Foram utilizados 68 camundongos da linhagem isogênica Balb/c (62 fêmeas e 06 machos), com idade aproximada de oito semanas ao início do período experimental. Procedimentos envolvendo animais foram realizados seguindo as normas do CONCEA, Brasil e do CEUA, UFSM (parecer 048/2014).

Para a obtenção do inóculo foram usados tecidos encefálicos de oito camundongos fêmeas Swiss adultas cronicamente infectadas, entre 60 e 90 dias pós-infecção (p.i.) com *T. gondii*, cepa ME-49 (do tipo II, cistogênica) mantida *in vivo* pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da UFSM. As massas encefálicas foram coletadas em condições estéreis, pesadas e maceradas em 1ml de tampão PBS a pH 7,2. Os cistos de bradizoítos foram contados por inspeção microscópica de três alíquotas de 20µl de cada encéfalo macerado (OLDENHOVE et al., 2009). Após a contagem, a solução foi diluída em PBS a pH 7,2 na concentração equivalente a 50 cistos em cada 150µl.

Etapa I: 62 fêmeas Balb/c foram destinadas, aleatoriamente, à infecção experimental (n=42) ou placebo (n=20). O inóculo consistiu de 50 cistos/animal, via oral, por gavagem, com uso de agulha odontológica curva, adaptada com ponta metálica esférica e romba (sonda rígida) acoplada a seringa de 1ml. A sonda foi introduzida cuidadosamente na cavidade oral até a passagem pela entrada do esôfago, onde o inóculo foi aplicado, evitando refluxo. O procedimento foi realizado por profissional treinado, com contenção manual dos animais. Para evitar interferência de potencial estresse ou lesão causados pela gavagem, animais que apresentaram sinais clínicos até 24h p.i. foram excluídos do estudo, e submetidos à eutanásia.

Frequência e intensidade de sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose foram avaliadas durante 85 dias. No exame clínico, os animais eram estimulados, pelo toque, a moverem-se pela gaiola. Diariamente, cada animal foi classificado conforme escore de sinais

clínicos: ausentes (grau 1); leves (grau 2), caracterizados por eriçamento do pelo no dorso; moderados (grau 3), caracterizados por pelo eriçado e apatia; graves (grau 4), caracterizados por pelo eriçado, apatia, anorexia, dificuldade de se mover pela gaiola; extremos (grau 5), caracterizados por pelo eriçado, anorexia, apatia severa, imobilidade ou decúbito. Procedeu-se a eutanásia dos animais que atingiram grau 5 (*in extremis*). A classificação foi feita pelo mesmo operador para todos os animais, examinados em sequência aleatória para cada dia de avaliação. Os escores clínicos foram registrados por outro operador, responsável pela identificação individual de cada animal.

Taxas de morbidade e mortalidade foram calculadas ao longo do período de observação. Foram considerados cronicamente infectados os animais que: a) receberam o inóculo; b) apresentaram quadro clínico compatível com toxoplasmose aguda; c) passaram por período de convalescência; e d) sobreviveram até o dia 85 p.i..

Etapa II: foram avaliados os efeitos da associação de busulfan e ciclofosfamida, em doses indicadas para mieloablação (PCT), na presença ou ausência de toxoplasmose, em fêmeas Balb/c. Para isso, fêmeas cronicamente infectadas (txI) receberam PCT (grupo txI+pctII, n=14) ou placebo (grupo txI+plaII, n=12); e fêmeas não-infectadas (plaI) receberam PCT (grupo plaI+pctII, n=10) ou placebo (grupo plaI+plaII, n=10).

O PCT consistiu de 20 mg/kg/dia de busulfan diluído em 100µl de solução de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA), por quatro dias consecutivos, pela via intraperitoneal (i.p.) + 100mg/kg/dia de ciclofosfamida em solução i.p. (Genuxal® Baxter Oncology GmbH, Alemanha), por dois dias consecutivos (PCT = 20 mg/kg/d Bu x 4d + 100 mg/kg/d Ci x 2d) (NILSSON et al., 2005). O placebo foi 100µl de água ultrapura i.p. por seis dias consecutivos. A etapa II correspondeu ao período do PCT, seguido de um dia de repouso (total de sete dias).

Na etapa II, além do escore clínico, cada animal teve seu peso corporal aferido, individualmente, em balança de precisão (mg). Toda a ração disponível nos comedouros foi retirada e pesada uma vez por dia, para estimativa do consumo médio diário por grupo. Após a pesagem, repunha-se quantidade equivalente a 20g de ração peletizada por camundongo/dia em cada comedouro. Essa avaliação teve a finalidade de verificar possível anorexia dos animais como efeito do PCT. Foram mantidos os mesmos critérios de classificação de escore clínico e de eutanásia *in extremis* supramencionados (na etapa I).

Etapa III: os grupos experimentais da etapa III foram formados de modo a permitir a avaliação dos efeitos isolados e associados de *T. gondii* (infecção crônica, na etapa I), PCT (aplicado na etapa II) e transplante de  $1 \times 10^6$  células alogênicas da fração mononuclear da medula óssea de doadores Balb/c machos (BMy), realizado na etapa III. Foram mantidas



apenas fêmeas que chegaram ao final da etapa II com escore clínico nos graus 1, 2 e 3. Os graus 4 e 5 foram considerados inviáveis. O transplante foi realizado no dia 93 p.i. (dia 0 da etapa III).

As fêmeas Balb/c infectadas por *T. gondii* (txI) ou livres de infecção (plaI) na etapa I, submetidas ao PCT (pctII) ou livres de imunossupressão (plaII) na etapa II, e transplantadas (bmyIII) ou não-transplantadas (plaIII) na etapa III, formaram os grupos: txI+pctII+plaIII (n=05); txI+pctII+bmyIII (n=07); plaI+pctII+plaIII (n=05); plaI+pctII+bmyIII (n=05); txI+plaII+plaIII (n=06); txI+plaII+bmyIII (n=06); plaI+plaII+plaIII (n=05); plaI+plaII+bmyIII (n=05).

As células BMy foram obtidas de fêmures e tíbias de 06 machos Balb/c adultos (doadores), após eutanásia, no dia do transplante. Os ossos foram isolados e seccionados nas extremidades, expondo o canal medular. Coletou-se a medula óssea, por pressão, embebida em meio de cultura DMEM-F12 injetado com seringa de 1ml e agulha 25G dentro do canal medular (TROPEL et al., 2004).

O conteúdo medular obtido foi submetido a pipetagens sucessivas e centrifugado em gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare, USA) por 30min. a 400g. As células da fração mononuclear, separadas por densidade, foram recuperadas, lavadas duas vezes em PBS (dois ciclos de ressuspensão e centrifugação a 400g por 5min.), ressuspensas em 2ml de DMEM-F12 e preparadas para o transplante, após contagem das células viáveis. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer (com alíquota diluída 1:1 em solução de azul de tripan a 0,4%), levando-se em consideração a viabilidade celular média de 62% acessada por citometria de fluxo (citômetro FACSVerse, BD Biosciences), com coloração por iodeto de propídio (BD Biosciences).

O transplante de  $1 \times 10^6$  células BMy viáveis/animal foi realizado pela via endovenosa (e.v.), na veia da cauda, utilizando agulha 25G acoplada a seringa de 1ml. Os grupos não-transplantados receberam 150 $\mu$ l de meio DMEM-F12 e.v. (placebo III).

Uma vez por dia, realizaram-se: avaliação clínica e pesagem individual (peso vivo); e pesagem da ração consumida por grupo. Os mesmos critérios de avaliação das etapas anteriores foram aplicados. Contudo, levando-se em conta a redução do *n* experimental, os escores de sinais clínicos 4 (graves) e 5 (extremos) foram agrupados na análise dos dados. O encéfalo de cada fêmea foi coletado para inspeção e contagem *post-mortem* de cistos teciduais de *T. gondii* (conforme descrito por OLDENHOVE et al., 2009).

Análise estatística: as frequências dos graus de escore clínico e as taxas de mortalidade foram analisadas pelo teste do qui-quadrado com 95% de confiança. Para isso foram

comparadas as contagens dentro de cada grupo experimental, em diferentes dias, e entre os grupos experimentais para cada dia de observação. A variação média de peso dos animais foi analisada pelo teste de Tukey-Kramer com 95% de confiança.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações clínicas não decorrentes de toxoplasmose (até 24h após a inoculação), foram motivo de eutanásia de cinco animais (5/42; 11,9%). Desse modo, 37 fêmeas Balb/c remanescentes foram consideradas infectadas. Sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose aguda iniciaram no dia 5 p.i. (2/37; 5,4%) e a morbidade atingiu os 100% no dia 7 p.i. (Tabela 1). Entre os dias 7 e 10 p.i., os sinais clínicos se agravaram em 100% dos animais. A taxa de mortalidade aguda atingiu 24,3% no dia 12 p.i. (Tabela 1 e Figura 1). Houve notável melhora nos escores clínicos, com evolução de graves para moderados, a partir do dia 11 p.i.. Sinais clínicos moderados a leves predominaram entre os dias 14 e 17 p.i. (Tabela 1) e permaneceram estáveis do dia 18 ao dia 23 p.i., caracterizando infecção crônica.

Na fase crônica da toxoplasmose (Tabela 2) predominaram sinais clínicos ausentes ou leves (pelo eriçado no dorso). Houve mortalidade de dois animais (dias 35 e 39 p.i.), aumento episódico na incidência de sinais clínicos moderados nos dias 40 e 41 p.i., e um animal apresentou sinais clínicos graves, pontualmente, no dia 40 p.i.. É possível que estes episódios não tenham sido provocados diretamente pela toxoplasmose, mas por algum fator de estresse social transitório (BELZUNG & GRIEBEL, 2001).

Em muitos casos, a toxoplasmose aguda pode ser assintomática, ou provocar sinais clínicos leves e inespecíficos. Isso ocorre, especialmente, com cepas cistogênicas (BOOTHROYD & GRIGG, 2002). Contudo, a inoculação oral de 50 cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 foi eficiente para estabelecer a infecção em 100% das fêmeas Balb/c. Além disso, a taxa de mortalidade não foi excessiva e os animais apresentaram-se clinicamente estáveis, com sinais clínicos ausentes a leves, entre os dias 44 a 85 p.i. (início da etapa II). Por sua vez, fêmeas Balb/c não-infectadas não apresentaram quaisquer alterações clínicas durante toda a etapa I deste estudo.

O peso médio de fêmeas Balb/c infectadas ( $17,0 \pm 1,9g$ ) e não-infectadas ( $20,2 \pm 1,4g$ ) diferiu ao final da etapa 1 (Figura 2), provavelmente, devido a perdas decorrentes do curso clínico da toxoplasmose. O emprego da média da variação diária de peso de cada grupo a partir da etapa 2 permitiu a anulação desse efeito, para fins comparativos, entre os grupos.

A Tabela 3 e a Figura 3 demonstram a evolução do quadro clínico dos animais durante a etapa II deste estudo. O grupo plaI+plaII se manteve sem alterações e, no grupo txI+plaII, não houve variação significativa. Por outro lado, no grupo plaI+pctII os sinais clínicos evoluíram de ausentes a leves a partir do dia 88 p.i., como efeito da quimioterapia. Além disso, no grupo txI+pctII, 100% dos animais apresentaram sinais clínicos e houve, ainda, maior frequência de sinais moderados a graves/extremos após a segunda dose de busulfan (dia 88 p.i.), culminando na eutanásia (*in extremis*) de dois animais (dias 91 e 92 p.i.).

A cepa cistogênica ME-49 apresenta baixa virulência em camundongos Balb/c imunocompetentes (SUZUKI et al., 2000; FUX et al., 2003). Porém, em hospedeiros imunocomprometidos, pode haver reativação de cepas cistogênicas, causando toxoplasmose cerebral e sistêmica (SAEIJ et al., 2005; AJZENBERG et al., 2009). No presente estudo, a infecção persistente por *T. gondii* agravou as alterações clínicas causadas pelo PCT, inclusive, com mortalidade precoce, durante a imunossupressão farmacológica (Figura 4).

A variação de peso médio diário a partir da etapa II do estudo (Figura 5) mostrou uma clara relação entre PCT e perda de condição corporal. Houve perda abrupta de peso nos grupos plaI+pctII e txI+pctII nos dias 87 a 90 p.i., e o peso corporal desses animais seguiu baixo até o dia do transplante alogênico. Nestes dois grupos, foi notável a anorexia entre os dias 88 e 90 p.i., como efeito das aplicações de busulfan (Figura 6). Contudo, o consumo de ração voltou ao normal nos dias subsequentes às aplicações de ciclofosfamida.

A Figura 7 mostra a evolução clínica de cada animal desde o período pré-transplante (dias 86 a 92 p.i.) até o 9º dia pós-transplante (dias 93 a 101 p.i.), conforme sua distribuição nos grupos da etapa III. As células BMy não causaram alterações clínicas significativas até o 9º dia pós-transplante (grupo plaI+plaII+bmyIII e txI+plaII+bmyIII). Semelhantemente, não houve variação digna de nota no quadro clínico dos animais do grupo txI+plaII+plaIII. Esses resultados indicam que o transplante alogênico de CFMO de doadores machos (BMy) não suprimiu a resposta imune das fêmeas Balb/c contra a toxoplasmose crônica. Além disso, não ocorreram quaisquer sinais de rejeição ao transplante ou de imunossupressão mediada pelas células BMy, no curto prazo (NAUTA et al., 2006).

A mortalidade atingiu 100% nas fêmeas Balb/c cronicamente infectadas por *T. gondii* e submetidas ao PCT (txI+pctII+plaIII e txI+pctII+bmyIII), em até dez dias após o início da quimioterapia, ou seja, no máximo quatro dias após o transplante. Durante a etapa II e início da etapa III, a imunossupressão farmacológica provocou sinais clínicos mais brandos em fêmeas não-infectadas (plaI+pctII+plaIII e plaI+pctII+bmyIII). O maior tempo de sobrevivência de alguns animais imunossuprimidos que receberam transplante (plaI+pctII+bmyIII), em

relação aos que não receberam (plaI+pctII+plaIII), não foi representativo. A mortalidade de animais submetidos ao PCT atingiu 100% até o dia 99 p.i., mesmo naqueles que receberam transplante de BMy.

Dessa forma, pode-se afirmar que fêmeas Balb/c cronicamente infectadas por *T. gondii* sofreram precocemente os efeitos do PCT (txI+pctII+plaIII e txI+pctII+bmyIII), ainda durante o período pré-transplante. Além disso, a quimioterapia resultou em alta taxa de mortalidade pós-transplante, mesmo nos animais não-infectados por *T. gondii*, já que nenhum animal submetido ao PCT sobreviveu além do dia 7 pós-transplante. Esse quadro se explica pela debilidade orgânica pronunciada que decorreu da quimioterapia.

O significado clínico desses achados pode ser bastante importante para transplantes alogênicos em humanos, haja vista a alta incidência de toxoplasmose em várias regiões do mundo (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; INNES, 2010) e o uso comum de imunossupressão farmacológica, inclusive com busulfan e ciclofosfamida, na preparação para o transplante de medula óssea (BLUME et al., 1993; DEEG et al., 2006; SCOTT et al., 2012). Em parte, resistência ou susceptibilidade a *T. gondii* dependem de fatores genéticos do hospedeiro, determinantes para a resposta imunológica inata, na infecção primária, ou adquirida, que evita a reativação da doença (ARAÚJO, 1991; SUZUKI et al., 2000; FUX et al., 2003). Dessa forma, quando um portador crônico tem a competência imunológica suprimida, aumenta o risco de reativação da toxoplasmose, com rompimento dos cistos de bradizoítos e disseminação de taquizoítos (ROEMER et al., 2001; AJZENBERG et al., 2009).

Na inspeção microscópica *post-mortem*, foram encontrados cistos de bradizoítos (Figura 8) nos tecidos encefálicos dos animais dos grupos txI+plaII+plaIII e txI+plaII+bmyIII. Não foram encontrados cistos em tecidos encefálicos nos grupos infectados submetidos ao PCT (txI+pctII+plaIII e txI+pctII+bmyIII). Isso demonstra que o agravamento do quadro clínico e a mortalidade de animais infectados esteve associada à ausência de cistos cerebrais de bradizoítos, indicando a reativação da doença.

Na literatura, são reportados quadros clínicos graves e óbito em pacientes acometidos por toxoplasmose aguda pós-transplante. Em muitos casos, o diagnóstico clínico não é realizado em tempo hábil, para que se possa realizar terapia específica contra o parasita e, não raro, a detecção do protozoário ocorre somente na necropsia (MARTINO et al., 2000; MEDEIROS et al., 2001; ROEMER et al., 2001; CIBICKOVA et al., 2007; DEROUIN & PELLOUX, 2008). Isso demonstra a importância de monitorar o curso clínico da toxoplasmose desde a preparação pré-transplante do paciente portador. No presente estudo, sinais clínicos graves e mortalidade ocorreram precocemente após o início do PCT em

portadores crônicos de *T. gondii*. Os efeitos da quimioterapia se agravaram na etapa III do estudo, coincidindo com o período em que deveria ocorrer o estabelecimento das células transplantadas, e o esperado efeito da terapia celular.

O curto período de sobrevivência dos animais após a quimioterapia foi desfavorável ao transplante. Variações nas doses e na ordem de aplicação de busulfan e ciclofosfamida podem ser preconizadas visando minimizar seus efeitos adversos (NILSSON et al., 2005). Contudo, a finalidade do PCT é promover mieloablação, suprimindo a população de células hematopoiéticas do hospedeiro, para facilitar o enxerto das células alogênicas (BLUME et al., 1993; NAUTA et al., 2006; ISHIDA et al., 2012). Isso justifica as altas doses dos quimioterápicos.

Uma vez que os animais perderam peso durante a quimioterapia, é possível que a concentração plasmática dos fármacos tenha se tornado mais elevada do que o previsto. Segundo Ljungman et al. (1997), em humanos, altas concentrações de busulfan na corrente sanguínea estão associadas a aumento na mortalidade até 100 dias após o transplante de medula óssea. Assim, a diminuição da dose de busulfan no PCT pode ser uma forma de reduzir a taxa de mortalidade pós-transplante. Porém, é necessário considerar que doses mais baixas podem ser insuficientes para a mieloablação.

## CONCLUSÕES

A inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49) foi eficiente para estabelecer infecção persistente, e permitiu caracterizar as fases aguda e crônica da toxoplasmose em fêmeas Balb/c adultas.

As fêmeas cronicamente infectadas por *T. gondii* apresentaram sinais clínicos graves e mortalidade precoce ao serem submetidas à imunossupressão farmacológica.

O protocolo de pré-condicionamento ao transplante alogênico, com 20mg/kg/dia de busulfan por 4 dias + 100mg/kg/dia de ciclofosfamida por 2 dias, foi demasiadamente agressivo, causando 100% de mortalidade, mesmo após o transplante alogênico de CFMO.

O transplante alogênico de  $1 \times 10^6$  CFMO de doadores machos (células BMy) para receptoras fêmeas demonstrou-se seguro nas fêmeas Balb/c que não foram submetidas à quimioterapia, independentemente de estarem infectadas ou livres de infecção por *T. gondii*.

**AGRADECIMENTOS:** Agradecemos o suporte financeiro da CAPES, com bolsa de doutorado, e do CNPq/FAPERGS (PRONEX - processo 10/0039-3- edital 008/2009), e o

apoio técnico do setor de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM).

## REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D. et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v.199, n.8, p.1155-1167, 2009.
- ARAUJO, F.G. Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Infection and Immunity**, v.59, n.5, p.1614-1619, 1991.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v.125, n.1, p.141-149, 2001.
- BLUME, K.G. et al. A prospective randomized comparison of total body irradiation-etoposide versus busulfan-cyclophosphamide as preparatory regimens for bone marrow transplantation in patients with leukemia who were not in first remission: a Southwest Oncology Group study. **Blood**, v.81, n.8, p.2187-2193, 1993.
- BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n.4, p.438-442, 2002.
- CIBICKOVA, L. et al. Cerebral toxoplasmosis in an allogeneic peripheral stem cell transplant recipient: case report and review of literature. **Transplant Infectious Disease**, v.9, n.4, p.332-335, 2007.
- DEEG, H.J. et al. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. **Blood**, v.108, n.5, p.1485-1491, 2006.
- DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.12, p.1089-1101, 2008.
- DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, p.1257-1278, 2008.
- FLEGR, J.; STRIZ, I. Potential immunomodulatory effects of latent toxoplasmosis in humans. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.274, 2011.
- FUX, B. et al. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.71, n.11, p.6392-6401, 2003.
- GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, n.2, p.155-159, 2007.

INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n.1, p.1-7, 2010.

ISHIDA, T. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. **Blood**, v.120, n.8, p.1734-1741, 2012.

LJUNGMAN, P. et al. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. **Bone Marrow Transplantation**, v.20, n.11, p.909-913, 1997.

MATOBA, S. et al. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. **American Heart Journal**, v.156, n.5, p.1010-1018, 2008.

MARTINO, R. et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.25, n.10, p.1111-1114, 2000.

MEDEIROS, B.C. et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. **Transplant Infectious Disease**, v.3, n.1, p.24-28, 2001.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v.363, n.9425, p.1965-1976, 2004.

NAUTA, A.J. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, v.108, n.6, p.2114-2120, 2006.

NILSSON, C. et al. Effect of altering administration order of busulphan and cyclophosphamide on the myeloablative and immunosuppressive properties of the conditioning regimen in mice. **Experimental Hematology**, v.33, n.3, p.380-387, 2005.

OLDENHOVE, G. et al. Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity**, v.31, n.5, p.772-786, 2009.

PEZERICO, S.B. et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. **Experimental Parasitology**, v.123, n.2, p.168-172, 2009.

RANDALL, L.M.; HUNTER, C.A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.1, n.1, p.3-9, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, n.2, p.264-296, 2012.

ROEMER, E. et al. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.e1-e8, 2001.

ROUX, E. et al. Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. **Blood**, v.79, n.10, p.2775-2783, 1992.

SAEIJ, J.P.J. et al. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v.21, n.10, p.476-481, 2005.

SAMDANI, A.F. et al. Transplantation of human marrow stromal cells and mono-nuclear bone marrow cells into the injured spinal cord: a comparative study. **Spine**, v.34, n.24, p.2605-2612, 2009.

SCOTT, L. et al. Intravenous busulfan: a guide to its use as conditioning treatment before transplantation of haematopoietic progenitor cells. **Clinical Drug Investigation**, v. 32, n. 9, p. 641-648, 2012.

SEEGER, F.H. et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v.28, n.6, p.766-772, 2007.

SPRADLING, A. et al. Stem cells find their niche. **Nature**, v.414, n.6859, p.98-104, 2001.

SUZUKI, Y. et al. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.164, n.10, p.5375-5382, 2000.

TATEISHI-YUYAMA, E. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. **The Lancet**, v.360, n.9331, p.427-435, 2002.

TROPEL, P. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, v.295, n.2, p.395-406, 2004.

VIDAL, J.E. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care & Stds**, v.19, n.10, p.626-634, 2005.

WOGNUM, A. et al. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. **Archives of Medical Research**, v.34, n.6, p.461-475, 2003.

WRIGHT, K.T. et al. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. **Stem Cells**, v.29, n.2, p.169-178, 2011.



Tabela 1. Curso clínico e taxa de mortalidade na fase aguda da infecção por *T. gondii* pós-inoculação (p.i.) oral de 50 cistos teciduais da cepa ME-49, em camundongos fêmeas Balb/c

Dia p.i.	Morbidade acumulada	Frequência de sinais clínicos nos sobreviventes (n=37) <sup>1</sup>					Mortalidade acumulada
		Ausentes	Leves	Moderados	Graves	Extremos	
1-4	0	100%	0	0	0	0	0
5	5,4%	97,3% <sup>a</sup>	0	2,7% <sup>b</sup>	0	2,7% <sup>b</sup>	0
6	5,4%	97,2% <sup>a</sup>	0	0	0	2,8% <sup>b</sup>	2,7%
7	100%	0	14,3% <sup>b</sup>	80,0% <sup>a</sup>	0	5,7% <sup>b</sup>	5,4%
8	100%	0	0	72,7% <sup>a</sup>	21,2% <sup>b</sup>	6,1% <sup>b</sup>	10,8%
9	100%	0	0	0	93,8% <sup>a</sup>	6,2% <sup>b</sup>	13,5%
10	100%	0	0	0	100%	0	18,9%
11	100%	0	0	26,7% <sup>b</sup>	66,7% <sup>a</sup>	6,6% <sup>b</sup>	18,9%
12	100%	0	0	42,9% <sup>a</sup>	57,1% <sup>a</sup>	0	24,3%
13	100%	0	0	82,1% <sup>a</sup>	17,9% <sup>b</sup>	0	24,3%
14	100%	0	28,6% <sup>b</sup>	71,4% <sup>a</sup>	0	0	24,3%
15	100%	0	28,6% <sup>b</sup>	67,8% <sup>a</sup>	3,6% <sup>c</sup>	0	24,3%
16	100%	0	28,6% <sup>b</sup>	67,8% <sup>a</sup>	3,6% <sup>c</sup>	0	24,3%
17	100%	0	35,7% <sup>a</sup>	60,7% <sup>a</sup>	3,6% <sup>b</sup>	0	24,3%
18-23	100%	0	96,4% <sup>a</sup>	3,6% <sup>b</sup>	0	0	24,3%

<sup>1</sup> Letras diferentes (a,b,c) na mesma linha indicam diferença significativa na frequência de sinais clínicos, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 2. Curso clínico na fase crônica da infecção por *T. gondii* pós-inoculação (p.i.) oral de 50 cistos teciduais da cepa ME-49, em camundongos fêmeas Balb/c

Dia p.i.	Frequência de sinais clínicos nos sobreviventes (n=28) <sup>1</sup>				
	Ausentes	Leves	Moderados	Graves	Extremos
24	25,0% <sup>b</sup>	75,0% <sup>a</sup>	0	0	0
25	53,6% <sup>a</sup>	46,4% <sup>a</sup>	0	0	0
26	75,0% <sup>a</sup>	25,0% <sup>b</sup>	0	0	0
27	96,4% <sup>a</sup>	3,6% <sup>b</sup>	0	0	0
28	96,4% <sup>a</sup>	0	3,6% <sup>b</sup>	0	0
29	96,4% <sup>a</sup>	0	3,6% <sup>b</sup>	0	0
30	92,8% <sup>a</sup>	3,6% <sup>b</sup>	3,6% <sup>b</sup>	0	0
31	96,4% <sup>a</sup>	0	3,6% <sup>b</sup>	0	0
32	96,4% <sup>a</sup>	3,6% <sup>b</sup>	0	0	0
33	96,4% <sup>a</sup>	0	3,6% <sup>b</sup>	0	0
34	96,4% <sup>a</sup>	0	3,6% <sup>b</sup>	0	0
35*	100%	0	0	0	0
36	96,3% <sup>a</sup>	0	3,7% <sup>b</sup>	0	0
37	96,3% <sup>a</sup>	0	3,7% <sup>b</sup>	0	0
38	74,1% <sup>a</sup>	22,2% <sup>b</sup>	3,7% <sup>b</sup>	0	0
39*	53,8% <sup>a</sup>	42,4% <sup>a</sup>	3,8% <sup>b</sup>	0	0
40	30,8% <sup>a</sup>	23,1% <sup>a</sup>	42,3% <sup>a</sup>	3,8% <sup>a</sup>	0
41	30,8% <sup>a</sup>	42,3% <sup>a</sup>	26,9% <sup>a</sup>	0	0
42	53,8% <sup>a</sup>	42,3% <sup>a</sup>	3,9% <sup>b</sup>	0	0
43	53,8% <sup>a</sup>	42,3% <sup>a</sup>	3,9% <sup>b</sup>	0	0
44-85	53,8% <sup>a</sup>	46,2% <sup>a</sup>	0	0	0

<sup>1</sup> Letras diferentes (a,b) na mesma linha indicam diferença significativa na frequência de sinais clínicos, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado.

\*Morte de um animal.

Tabela 3. Frequência de sinais clínicos (sobre o percentual de animais sobreviventes) a partir do início do protocolo de imunossupressão farmacológica (PCT) em camundongos Balb/c fêmeas infectados ou livres de infecção por *T. gondii*

Dias pós-infecção	Grupo	Frequência de sinais clínicos nos sobreviventes <sup>1</sup>			
		Ausentes	Leves	Moderados	Grav./Extr. <sup>2</sup>
<i>Busulfan (1ª dose)</i>					
Dia 86	txI+plaII (n=12)	41,7% <sup>a</sup>	58,3% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	42,9% <sup>a</sup>	50,0% <sup>a</sup>	7,1% <sup>b</sup>	0
	plaI+pctII (n=10)	100%	0	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Busulfan (2ª dose)</i>					
Dia 87	txI+plaII (n=12)	50,0% <sup>a</sup>	50,0% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	57,1% <sup>a</sup>	42,9% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+pctII (n=10)	100%	0	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Busulfan (3ª dose)</i>					
Dia 88	txI+plaII (n=12)	41,7% <sup>a</sup>	58,3% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	0	50,0% <sup>a</sup>	50,0% <sup>a</sup>	0
	plaI+pctII (n=10)	60,0% <sup>a</sup>	40,0% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Busulfan (4ª dose)</i>					
Dia 89	txI+plaII (n=12)	66,7% <sup>a</sup>	33,3% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	0	35,7% <sup>a</sup>	64,3% <sup>a</sup>	0
	plaI+pctII (n=10)	30,0% <sup>a</sup>	70,0% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Ciclofosfamida (1ª dose)</i>					
Dia 90	txI+plaII (n=12)	33,3% <sup>a</sup>	66,7% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	0	21,4% <sup>b</sup>	71,5% <sup>a</sup>	7,1% <sup>b,*</sup>
	plaI+pctII (n=10)	40,0% <sup>a</sup>	60,0% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Ciclofosfamida (2ª dose)</i>					
Dia 91	txI+plaII (n=12)	33,3% <sup>a</sup>	66,7% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	0	53,8% <sup>a</sup>	38,5% <sup>ab</sup>	7,7% <sup>b,*</sup>
	plaI+pctII (n=10)	50,0% <sup>a</sup>	50,0% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0
<i>Repouso pré-transplante</i>					
Dia 92	txI+plaII (n=12)	33,3% <sup>a</sup>	66,7% <sup>a</sup>	0	0
	txI+pctII (n=14)	0	75,0% <sup>a</sup>	25,0% <sup>b</sup>	0
	plaI+pctII (n=10)	40,0% <sup>a</sup>	60,0% <sup>a</sup>	0	0
	plaI+plaII (n=10)	100%	0	0	0

<sup>1</sup>Letras diferentes (a,b) na mesma linha indicam diferença significativa na frequência de sinais clínicos, com  $p < 0,1$  pelo teste do qui-quadrado.

<sup>2</sup>Grav./Extr.= soma das frequências de animais com sinais clínicos graves e extremos.

\*Submetido à eutanásia *in extremis*.

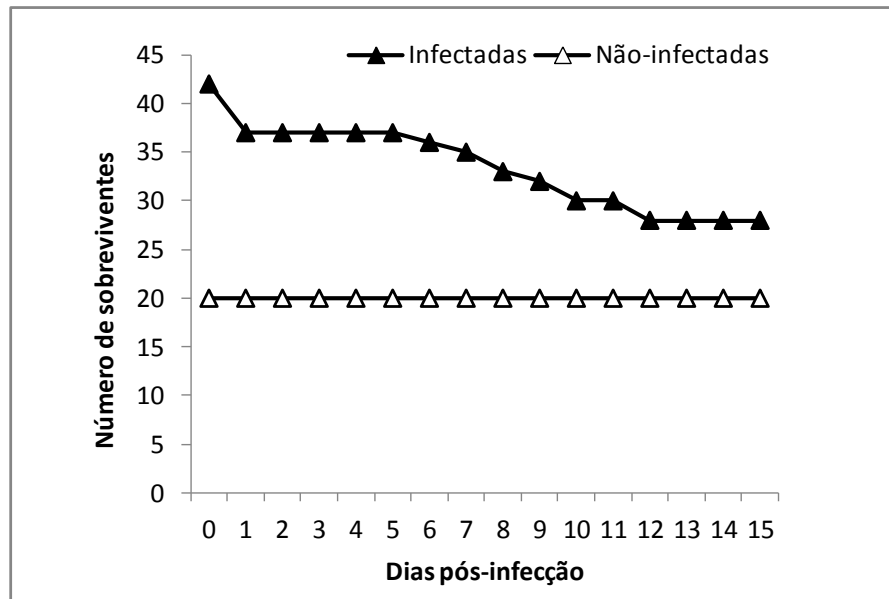


Figura 1. Número de sobreviventes na fase aguda da infecção em fêmeas Balb/c, das quais: 42 receberam 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49) no dia 0 pela via oral (infectadas); e 20 foram mantidas como controles (não-infectadas). A mortalidade entre os dias 0 e 1 não foi atribuída à infecção por *T. gondii*, mas ao procedimento de inoculação oral por gavagem.

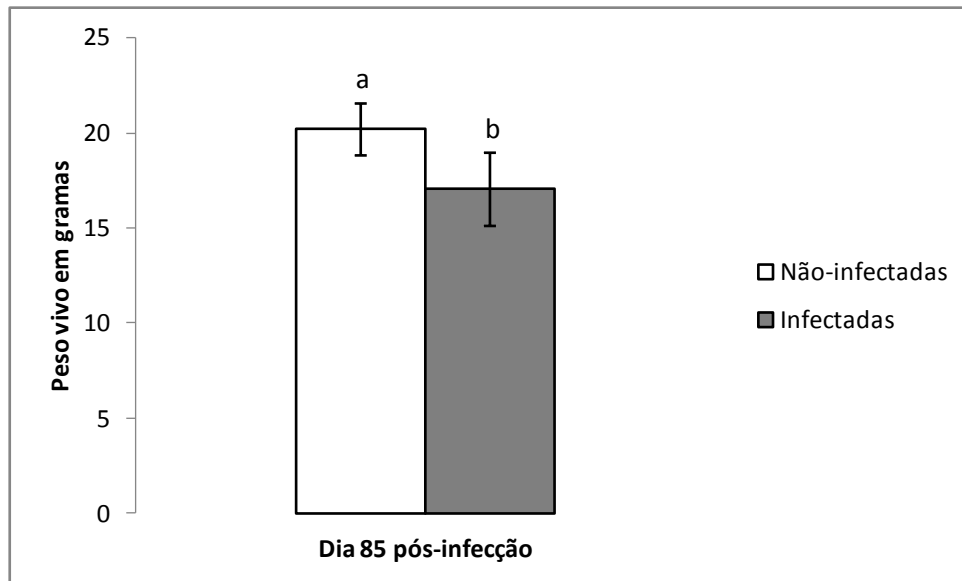


Figura 2. Peso vivo médio de fêmeas Balb/c infectadas por *T. gondii* e não-infectadas (controles), 85 dias depois da inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49). Letras diferentes (a, b) indicam diferença entre médias de peso vivo pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0.0001$  com intervalo de confiança de 95%.

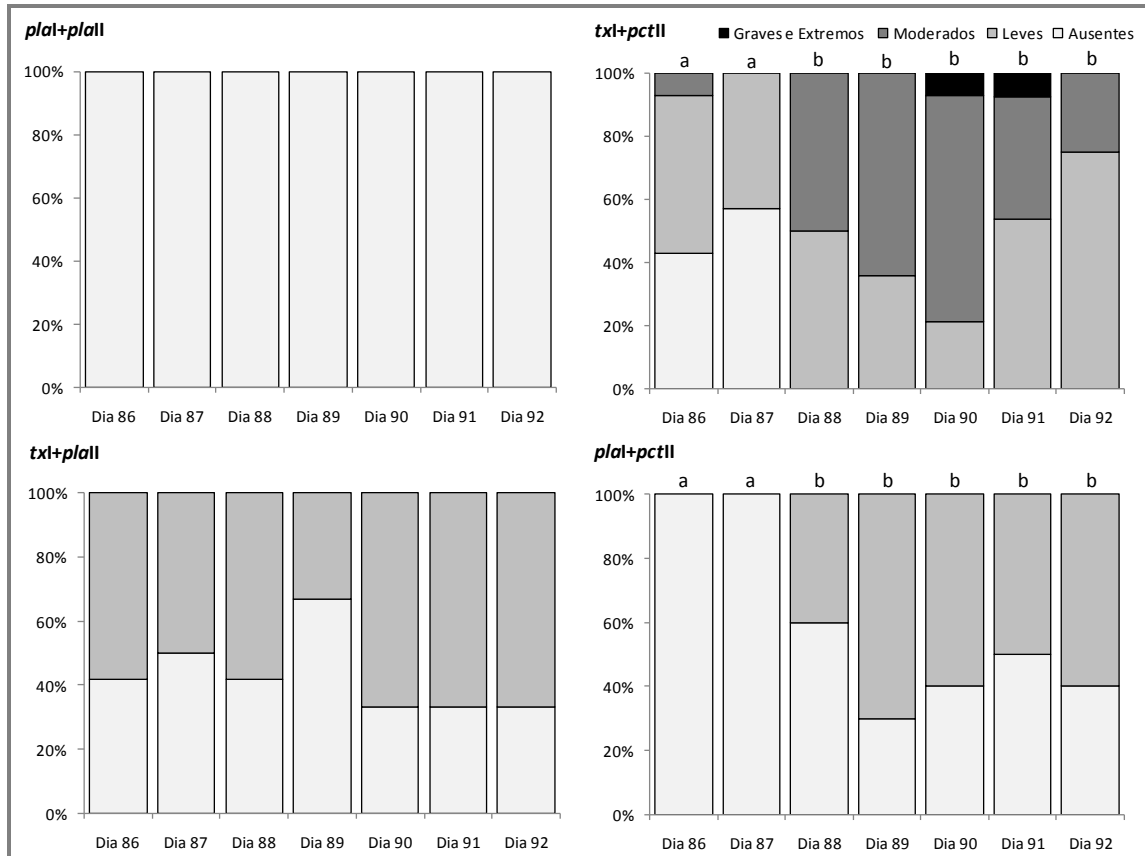


Figura 3. Frequência e intensidade de sinais clínicos, considerando-se o percentual de sobreviventes, a partir do início do pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT) em fêmeas Balb/c infectadas por *T. gondii* e não-infectadas. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Letras diferentes (a, b) indicam frequências diferentes em um mesmo grupo ao longo dos dias, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado.

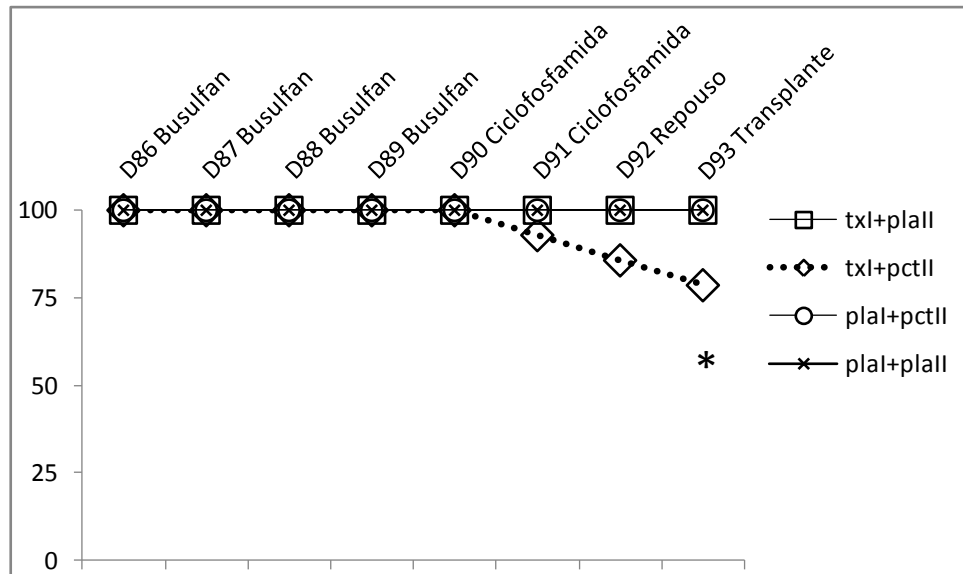


Figura 4. Percentual de sobreviventes a partir do início do pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT) até o dia do transplante de BMy. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). O asterisco (\*) indica que txI+pctII é diferente dos demais grupos no dia 93 p.i., pelo teste do qui-quadrado com  $p < 0,1$ .

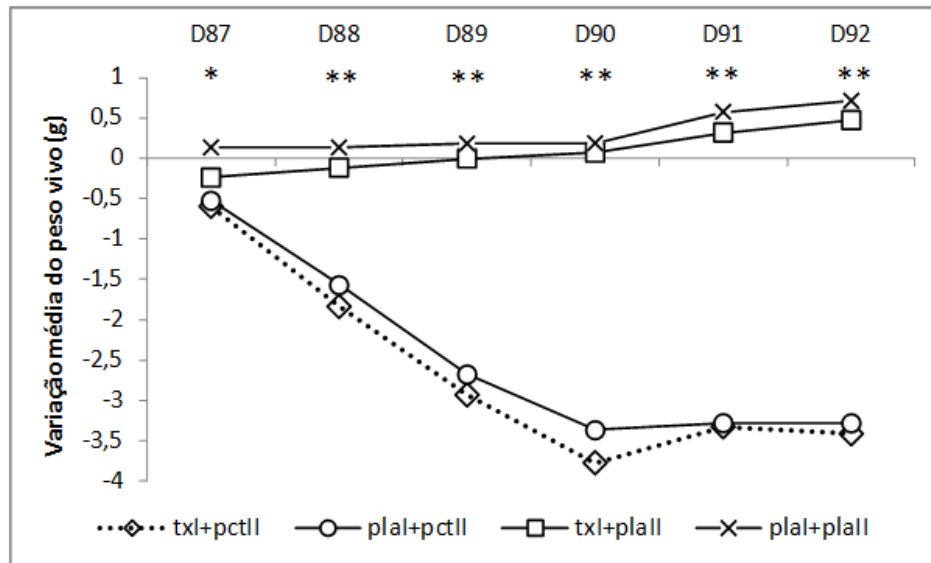


Figura 5. Variação do peso vivo médio por grupo durante o período de pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT). txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0,05$ . (\*) Os grupos plaI+plaII e txI+plaII são diferentes de txI+pctII. (\*\*) Os grupos plaI+plaII e txI+plaII são diferentes de plaI+pctII e txI+pctII.



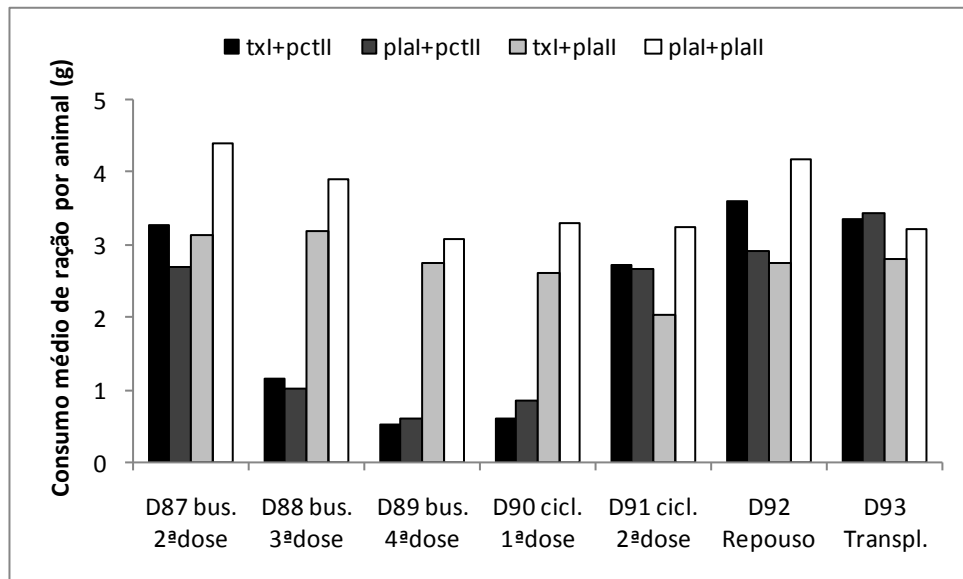


Figura 6. Consumo médio diário de ração por animal por grupo. txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). Nota-se que os animais diminuíram drasticamente o acesso à ração no comedouro como consequência do tratamento com busulfan.

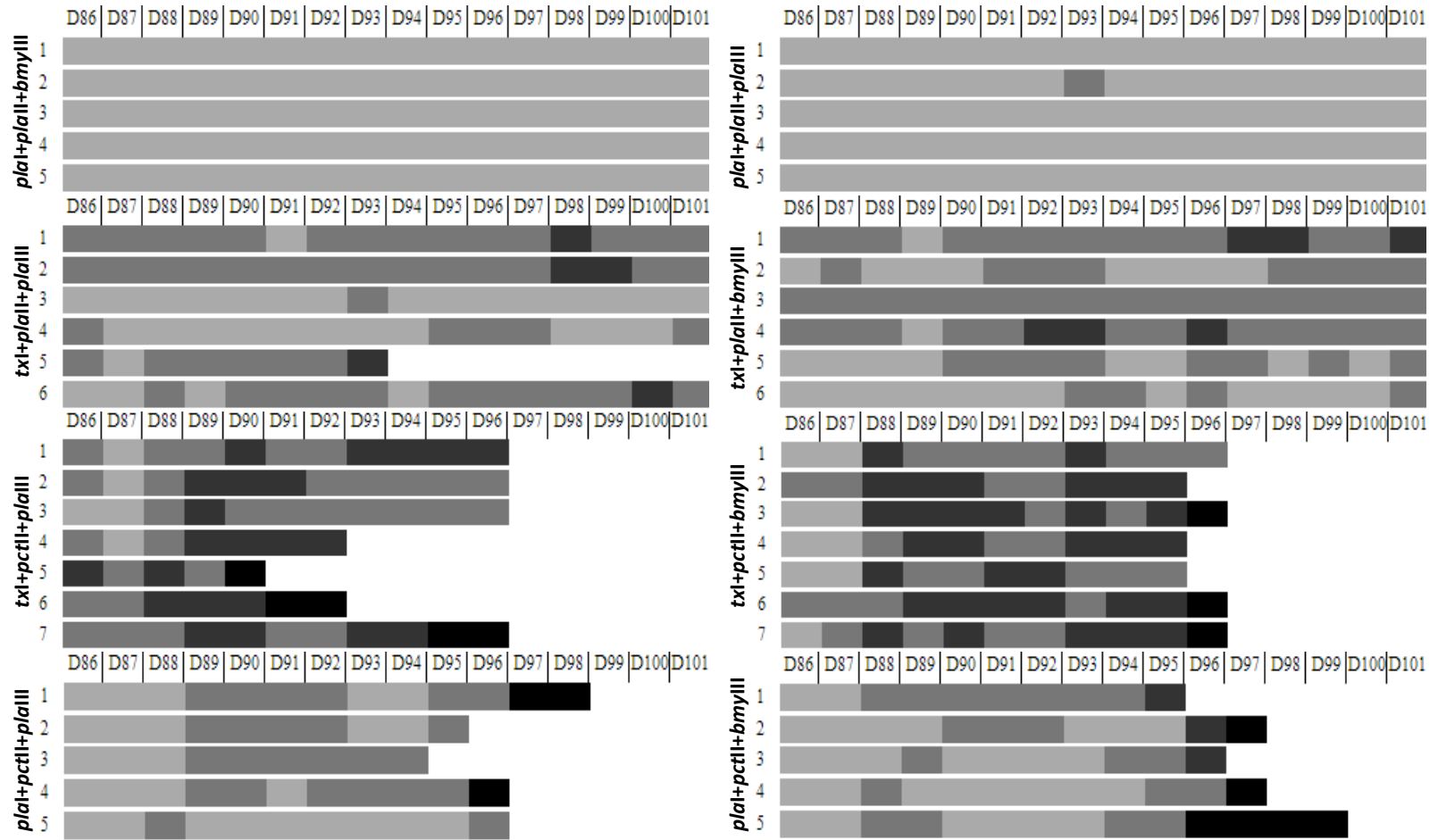


Figura 7. Intensidade dos sinais clínicos por animal ao longo dos períodos pré-transplante (dias 86 a 92 p.i.) e pós-transplante (dias 93 a 101 p.i.). txI: infectadas na etapa I; pctII: submetidas ao PCT na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT). A intensidade de cada matiz representa os sinais clínicos: ausentes (claro); leves (cinza claro); moderados (cinza escuro); graves/extremos (preto). O final da coluna indica morte do animal.

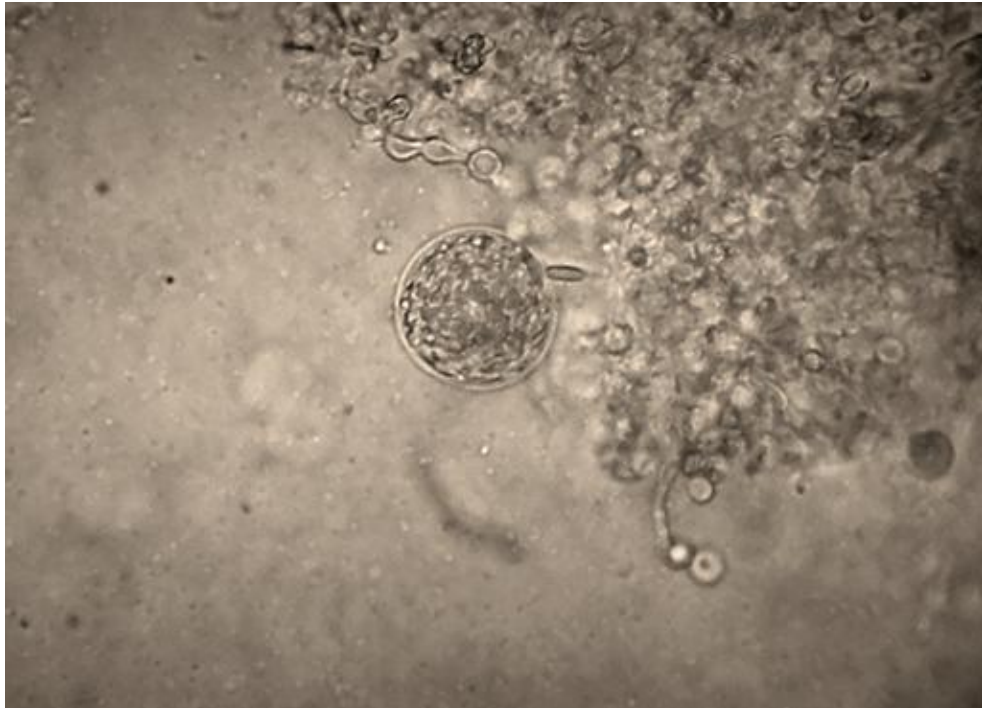


Figura 8. Cisto de bradizoítos (estrutura esférica ao centro, em destaque) encontrado em lâmina de tecidos encefálicos de camundongo fêmea Balb/c cronicamente infectada com *T. gondii*. Aumento de 200x.

## 5. CAPÍTULO 3 – Artigo científico.

### **DOSES REDUZIDAS DE BUSULFAN E CICLOFOSFAMIDA NO PRÉ- CONDICIONAMENTO PARA O TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS PORTADORAS DE *Toxoplasma gondii***

#### **Conditioning with reduced doses of busulfan and cyclophosphamide for allogeneic transplantation of bone marrow mononuclear cells in female mice chronically infected by *Toxoplasma gondii***

Alfredo Skrebsky Cezar<sup>1</sup>, Werner Giehl Glanzner<sup>1</sup>, Paulo Afonso Anezi-Júnior<sup>1</sup>, Lady Katerine Serrano-Mujica<sup>1</sup>, Giovana Camillo<sup>2</sup>, Fabio Vasconcellos Comim<sup>3</sup>, Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>2</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep).

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR).

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, UFSM, BioRep.

## **RESUMO**

Toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, o qual acomete cerca de um terço da população humana. Na infecção primária, taquizoítos se multiplicam e causam destruição celular. No entanto, sua disseminação tende a ser controlada pelo organismo imunocompetente. Como mecanismo de evasão à resposta imune, o parasita forma cistos teciduais de bradizoítos (semilatentes) e mantém o hospedeiro cronicamente infectado, geralmente, assintomático. O pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT) envolve imunossupressão do paciente, com mieloablação. Esse procedimento facilita a enxertia e inibe a rejeição ao transplante. Contudo, em portadores de *T. gondii*, a imunossupressão predispõe à reativação da toxoplasmose aguda (disseminada) que pode causar doença clínica grave e morte. Este estudo visou avaliar os efeitos de um regime de imunossupressão farmacológica, com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>) como alternativa para minimizar os riscos inerentes ao pré-condicionamento em camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* e

submetidos ao transplante alogênico de células mononucleares da medula óssea. O estudo teve três etapas subsequentes. Na etapa I, onze fêmeas Balb/c (grupo TgI) foram infectadas com 50 cistos teciduais de *T. gondii* da cepa VEG (cistogênica), e 23 fêmeas Balb/c foram mantidas como grupo controle (placebo; grupo plaI) durante um período de 120 dias. Na etapa II, as fêmeas cronicamente infectadas (TgI) ou não-infectadas (plaI) foram submetidas ao PCT*dr* (pct*dr*II) ou receberam placebo (plaII). Na etapa III, essas fêmeas foram redistribuídas em novos grupos experimentais e receberam transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea de camundongos machos (bmyIII) ou placebo (plaIII). Foram avaliados escore clínico, variação diária de peso vivo, consumo de ração e presença de cistos teciduais de bradizoítos nos tecidos encefálicos. O PCT*dr* não provocou reativação da toxoplasmose nas fêmeas Balb/c portadoras de *T. gondii*. O transplante alogênico de células da fração mononuclear da medula óssea de camundongos machos foi seguro para fêmeas Balb/c clinicamente saudáveis, independentemente de serem portadoras de *T. gondii*.

**Palavras-chave:** imunossupressão farmacológica, alotransplante, toxoplasmose, terapia celular, Balb/c.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*, which affects about one-third of the human population. In primary *T. gondii* infection, tachyzoites multiplication results in cell destruction. However, parasite dissemination tends to be controlled in immunocompetent organisms. The parasite uses mechanisms to evade the immune response, forming tissue cysts of bradyzoites (semilattent), maintaining the host chronically infected and, generally, asymptomatic. Preconditioning for allogeneic transplantation (PCT) involves immunosuppression of the patient, with myeloablation. This procedure facilitates the grafting and inhibits graft rejection. However, in patients with *T. gondii*, immunosuppression predisposes to reactivation of acute (disseminated) toxoplasmosis that can cause severe clinical disease and death. This study aimed to evaluate the effects of a drug immunosuppressive regimen with reduced doses of busulfan and cyclophosphamide (PCT*dr*) as an alternative to minimize the risks of conditioning in mice chronically infected with *T. gondii* and submitted to allogeneic transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells. The study had three subsequent steps. In step I, eleven female Balb/c (group TgI) were infected with 50 tissue cysts of *T. gondii* (VEG strain, cystogenic), and 23 female Balb/c were kept as control (placebo; group

plaI) over a 120 days period. In step II, chronically infected (TgI) or uninfected (plaI) females were submitted to PCTdr (pctdrII) or placebo (plaII). In step III, these mice were re-distributed in new experimental groups that received transplantation of allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells from male mice (bmyIII) or placebo (plaIII). Clinical scores, daily variation of body weight, feed intake and presence of cysts of bradyzoites in brain tissues were evaluated. PCTdr did not cause reactivation of toxoplasmosis in female Balb/c infected by *T. gondii*. Transplantation of allogeneic bone marrow-derived mononuclear cells from male mice was safe to clinically healthy female Balb/c, regardless chronic infection by *T. gondii*.

**Key words:** pharmacological immunosuppression, allogeneic transplantation, toxoplasmosis, cell therapy, Balb/c.

## INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Estima-se que um terço da população humana ao redor do mundo seja de portadores do parasita (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; AJZENBERG et al., 2009; INNES, 2010). Em geral, o hospedeiro é capaz de controlar a infecção aguda, mas se torna portador crônico. Isso se deve ao equilíbrio na relação entre a biologia do parasita e a resposta imunológica. O protozoário se apresenta em duas formas principais no hospedeiro intermediário: taquizoítos, que se multiplicam rapidamente no ambiente intracelular, provocam destruição das células infectadas e, a partir delas, se disseminam para células vizinhas (GADDI & YAP, 2007; AJZENBERG et al., 2009; RANDALL & HUNTER, 2011); e bradizoítos (forma de semilátência) contidos em cistos teciduais, que os protegem do ataque dos mecanismos de defesa imunológica (BOOTHROYD & GRIGG, 2002; MONTROYA & LIESENFELD, 2004). A toxoplasmose crônica tende a ser assintomática. Todavia, podem haver complicações, dependendo da abundância e da localização dos cistos, como em tecidos oculares ou cerebrais, por exemplo (TORREY et al., 2012).

Imunossupressão predispõe o portador à reativação da toxoplasmose aguda (MEDEIROS et al., 2001; ROEMER et al., 2001; VIDAL et al., 2005), que é caracterizada pelo rompimento de cistos de bradizoítos e liberação de taquizoítos (RANDALL & HUNTER, 2011). O organismo imunocomprometido é incapaz de controlar a multiplicação dos taquizoítos, que se disseminam, podendo levar a doença sistêmica e culminar no óbito (CIBIKOVA et al., 2007; AJZENBERG et al., 2009).

A imunossupressão farmacológica é um procedimento comumente realizado no pré-condicionamento para o transplante alogênico (PCT), com a finalidade de promover mieloablação (LJUNGMAN et al. 1997; ZHAO et al., 2014). O PCT tem as funções de inibir a rejeição ao alotransplante e facilitar a enxertia (ROUX et al., 1992; ZHAO et al., 2014). No entanto, com a ablação de medula óssea tem-se imunossupressão generalizada (RAIOLA et al., 2013), condição que traz grandes riscos a pacientes infectados por *T. gondii* (ROEMER et al., 2001; CIBIKOVA et al., 2007; DEROUIN & PELLOUX, 2008).

Busulfan e ciclofosfamida são quimioterápicos comumente usados no regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico (BLUME et al., 1993; ZHAO et al., 2014). Contudo, os efeitos adversos da quimioterapia são bastante significativos. Por isso, variações de fatores como tempo de terapia, doses, ordem e frequência de aplicação das duas drogas, são alvos de estudo, visando minimizar os danos do PCT sem prejudicar o transplante alogênico (BLUME et al., 1993; LJUNGMAN et al. 1997; NILSSON et al., 2005; ZHAO et al., 2014). Nesse sentido, modelos animais com camundongos são extremamente úteis para avaliar possíveis efeitos de modificações no PCT (NILSSON et al., 2005).

Camundongos da linhagem Balb/c são resistentes à infecção aguda por cepas cigotênicas de *T. gondii*, como VEG e ME-49 e se tornam portadores crônicos do parasita (SAEIJ et al., 2005; PEZERICO et al., 2009). Demonstrou-se que o PCT com 20mg/kg/dia de busulfan por 4 dias consecutivos + 100mg/kg/dia de ciclofosfamida por 2 dias consecutivos (doses indicadas para mieloablação) causa mortalidade em fêmeas Balb/c, e que esse efeito é precoce na presença de infecção crônica por *T. gondii* (Capítulo 2 desta tese). No mesmo estudo, demonstrou-se a segurança do transplante de células mononucleares da medula óssea de machos (doadores) para fêmeas (receptoras) infectadas por *T. gondii*, que não foram submetidas ao PCT.

O objetivo do atual estudo foi avaliar os efeitos clínicos e a segurança de um regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico, com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>), seguido de transplante sistêmico (endovenoso) de células da fração mononuclear da medula óssea de camundongos machos (doadores) para fêmeas (receptoras) cronicamente infectadas por *T. gondii*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 34 camundongos fêmeas e três machos da linhagem isogênica Balb/c, com idade aproximada de oito semanas (no início do período experimental). O estudo

foi conduzido em biotério de experimentação, sob condições controladas, e conforme as normas do CONCEA, Brasil e CEUA/UFSM (Parecer 048/2014).

Etapa I: onze fêmeas Balb/c foram infectadas com cistos de bradizoítos da cepa VEG de *T. gondii* (do tipo III, cistogênica), formando o grupo TgI. Outras 23 fêmeas Balb/c receberam placebo I (grupo plaI).

O inóculo foi obtido de camundongos Swiss fêmeas (90 a 110 dias pós-infecção) utilizadas para manutenção da cepa em laboratório de diagnóstico de toxoplasmose. Para a coleta dos cistos de bradizoítos, realizou-se a eutanásia dos animais e a retirada da massa encefálica em condições estéreis. Cada encéfalo foi pesado e macerado em 1ml de PBS a pH 7,2. Os cistos teciduais foram contados por avaliação microscópica de três alíquotas de 20µl por encéfalo (OLDENHOVE et al., 2009). Após isso, a solução foi diluída em PBS a pH 7,2 na concentração equivalente a 50 cistos/150µl de solução. Cada dose de 50 cistos/animal foi inoculada nas fêmeas Balb/c, por via oral, diretamente no esôfago, por gavagem (procedimento descrito detalhadamente no Capítulo 2 desta tese).

Ambos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições por um período de 120 dias, para o estabelecimento de toxoplasmose crônica nas fêmeas infectadas (TgI). Foram consideradas cronicamente infectadas aquelas que: a) receberam o inóculo; b) apresentaram quadro clínico compatível com toxoplasmose aguda; c) passaram por período de convalescência; e d) sobreviveram até o dia 120 p.i..

Etapa II: foram usadas 10 fêmeas infectadas e 23 fêmeas não-infectadas remanescentes da etapa I. A etapa II abrangeu o período pré-transplante, durante o regime de pré-condicionamento. O PCTdr consistiu na aplicação de 4mg/kg/dia de busulfan (Sigma-Aldrich, EUA) por quatro dias consecutivos + 50mg/kg/dia de ciclofosfamida por dois dias consecutivos (PCTdr = 4mg/kg/d Bu x 4d + 50mg/kg/d Ci x 2d).

Os quimioterápicos foram aplicados pela via intraperitoneal (i.p.), sendo o busulfan diluído em 100µl de solução de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA), e a ciclofosfamida, em água para injeção, no volume total de 100µl (Genuxal® Baxter Oncology GmbH, Alemanha), conforme recomendações dos fabricantes. Para os grupos que não receberam PCTdr, 100µl de água ultrapura i.p. por seis dias consecutivos foram aplicados como placebo (plaII).

O PCTdr foi aplicado em 04 fêmeas cronicamente infectadas por *T. gondii* (TgI+pctdrII) e em 10 fêmeas não-infectadas (plaI+pctdrII). O placebo foi aplicado em seis fêmeas cronicamente infectadas por *T. gondii* (TgI+plaII) e em 14 fêmeas não-infectadas (plaI+plaII). O *n* experimental em cada grupo da etapa II foi bastante variável, uma vez que foram levados em conta: restrições ao uso de animais em experimentos, conforme normas de



ética e bem-estar animal; a quantidade de cistos teciduais disponíveis no dia da inoculação experimental (o que, por sua vez, foi determinado pelo número de fêmeas Swiss cronicamente infectadas disponíveis); e o delineamento experimental da etapa III, dependente da distribuição prévia dos animais nos grupos experimentais na etapa II.

Etapa III: abrangeu o transplante alogênico (machos-fêmeas) e o período pós-transplante, nas fêmeas Balb/c remanescentes da etapa II. Células da fração mononuclear da medula óssea de doadores machos (BMy) foram obtidas de três camundongos Balb/c adultos. A coleta de medula óssea dos doadores foi realizada no dia do transplante, após eutanásia, conforme descrito por Tropel et al. (2004). Fêmures e tíbias foram isolados e tiveram suas extremidades seccionadas para exposição do canal medular. Para a coleta de medula, foi injetado DMEM-F12 com seringa de 1ml e agulha 25G acoplada ao canal medular, exercendo pressão para remoção da medula óssea total, embebida em meio de cultivo, sobre placa estéril.

Em sequência, o conteúdo obtido foi submetido a pipetagens sucessivas para separação e suspensão das células em DMEM-F12. A suspensão celular foi centrifugada em gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare, EUA) por 30min. a 400g. As células da fração mononuclear, separadas por densidade, foram recuperadas, lavadas duas vezes em PBS (dois ciclos de ressuspensão e centrifugação a 400g por 5min.), ressuspensas em DMEM-F12 e preparadas para o transplante. Para isso, realizou-se a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer (alíquota diluída 1:1 em solução de azul de tripan a 0,4%).

A dose transplantada para cada fêmea foi de  $1 \times 10^6$  BMy viáveis (com viabilidade celular de 70%). O transplante de células BMy (bmyIII) foi realizado pela via endovenosa (e.v.), na veia da cauda, com agulha 25G acoplada a seringa de 1ml. Nos grupos que não-transplantados, cada fêmea recebeu a aplicação de DMEM-F12 e.v. como placebo (plaIII).

Assim, na etapa III, fêmeas Balb/c cronicamente infectadas formaram os grupos: TgI+pctdrII+bmyIII (n=4), infectado, pré-condicionado e transplantado; TgI+plaII+bmyIII (n=3), infectado e transplantado sem pré-condicionamento; e TgI+plaII+plaIII (n=3), controle cronicamente infectado. Fêmeas não-infectadas formaram os grupos: plaI+pctdrII+bmyIII (n=4), pré-condicionado e transplantado; plaI+pctdrII+plaIII (n=6), apenas pré-condicionado; plaI+plaII+bmyIII (n=7), apenas transplantado; plaI+plaII+plaIII (n=7), apenas placebo.

Durante as etapas II e III foram avaliadas a frequência e a intensidade de sinais clínicos compatíveis com reativação da toxoplasmose ou decorrentes do PCTdr e do transplante alogênico. Diariamente, cada animal foi classificado conforme escore de sinais clínicos: ausentes (grau 1); leves (grau 2), caracterizados por eriçamento do pelo no dorso; moderados (grau 3), caracterizados por pelo eriçado e apatia; graves (grau 4), caracterizados

por pelo eriçado, apatia, anorexia, dificuldade de se mover pela gaiola; e extremos (grau 5), caracterizados por pelo eriçado, anorexia, apatia severa, imobilidade ou decúbito. No exame clínico, os animais foram estimulados, pelo toque, a moverem-se pela gaiola. A classificação foi feita pelo mesmo operador para todos os animais, examinados em sequência aleatória em cada dia de avaliação. Os escores clínicos foram registrados por outro operador, responsável por identificar individualmente cada animal no momento do exame e proceder as pesagens.

Cada animal teve seu peso corporal aferido, individualmente, em balança de precisão (mg). Toda a ração disponível nos comedouros foi retirada e pesada uma vez por dia, para estimativa do consumo médio diário por grupo. Após a pesagem, repunha-se quantidade equivalente a 20g de ração peletizada por camundongo/dia em cada comedouro. Essa avaliação teve a finalidade de caracterizar possível anorexia dos animais.

Procedeu-se a eutanásia das fêmeas Balb/c no 14º dia após o início do PCT<sub>dr</sub> (7º dia após o transplante de células BMy). Os tecidos encefálicos dessas fêmeas foram coletados *post-mortem* para pesquisa de cistos teciduais de *T. gondii*, conforme descrito anteriormente.

As frequências de escore clínico foram analisadas pelo teste do qui-quadrado com 95% de confiança. Para isso, foram comparadas suas frequências dentro de um mesmo grupo, a cada dia e, entre grupos distintos, para cada dia de observação. A variação média de peso dos animais foi analisada pelo teste de Tukey-Kramer com 95% de confiança.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as fêmeas Balb/c inoculadas com 50 cistos teciduais de bradizoítos da cepa VEG de *T. gondii* apresentaram sinais clínicos de toxoplasmose aguda entre a segunda e a terceira semana pós-infecção (p.i.), culminando na morte de uma fêmea (1/11). A partir da terceira semana de infecção houve melhora progressiva do quadro clínico, até a ausência de quaisquer sinais clínicos entre os dias 30 a 120 p.i.. Esses resultados foram similares aos observados com a cepa ME-49 de *T. gondii* em camundongos fêmeas Balb/c (Capítulo 2 desta tese), e demonstram um quadro de toxoplasmose aguda na infecção primária, seguida de infecção persistente assintomática (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Os animais do grupo plaI (controle) não apresentaram alterações clínicas ao longo de toda a etapa I.

No final da etapa I (120 dias p.i.), a média de peso vivo diferiu entre fêmeas infectadas e não-infectadas (Figura 1). Esse resultado esteve dentro do esperado, podendo-se considerar que a infecção por *T. gondii* prejudicou o desenvolvimento dos animais. Para evitar a influência desta diferença nas análises subsequentes (etapas II e III), as comparações

relacionadas a peso corporal foram realizadas pelo cálculo da variação do peso médio diário em relação ao peso médio inicial (aos 120 dias p.i.) dos animais de cada grupo.

Conforme se demonstra na Figura 2, o *PCTdr* provocou perda de peso significativa nos animais entre 4º e o 6º dia de quimioterapia (grupos plaI+pctdrII e TgI+pctdrII). Contudo, esse efeito não foi severo até o dia do transplante alogênico (6º dia). Além disso, acreditava-se que o *PCTdr* provocaria maiores perdas nos animais portadores de toxoplasmose crônica do que naqueles não-infectados. Porém, esse efeito não se confirmou.

A influência do *PCTdr* na frequência e na intensidade dos sinais clínicos durante a etapa II foi pouco representativa (Figura 3). Foram observados apenas sinais clínicos leves nos grupos submetidos ao *PCTdr* (plaI+pctdrII e TgI+pctdrII). Contudo, também foram observados sinais clínicos leves em fêmeas cronicamente infectadas que receberam placebo na etapa II (TgI+plaII). Não houve sinais clínicos no grupo controle que recebeu apenas placebo (plaI+plaII). Disso, é importante destacar que, além de não ter havido sinais clínicos de moderados a graves durante toda o curso do pré-condicionamento (etapa II), a combinação entre toxoplasmose crônica e *PCTdr* não provocou sinais clínicos importantes ou mortalidade de animais. Esse padrão de evolução dos sinais clínicos indica que não houve reativação da toxoplasmose aguda (ROEMER et al., 2001; DELLACASA-LINDBERG et al., 2007).

Na Figura 4 e na Tabela 1 estão apresentados os resultados referentes à variação média diária de peso de cada animal, por grupo experimental, na etapa III, que abrangeu o dia do transplante e o período pós-transplante. Identifica-se um padrão de maior perda de peso na fase pós-transplante relacionada com o tratamento prévio com o *PCTdr*. Essa diferença ficou mais evidente no grupo TgI+pctdrII+bmyIII, no 3º e no 7º dias pós-transplante, e nos grupos plaI+pctdrII+plaIII e plaI+pctdrII+bmyIII, desde o 2º até o 7º dia pós-transplante.

No estudo descrito no Capítulo 2 desta tese, demonstrou-se que a anorexia foi um efeito notório causado pelo PCT (com doses altas de busulfan e ciclofosfamida). Contudo, efeito semelhante não foi observado com o *PCTdr*, haja visto que, na etapa II do presente estudo, não houve diferença no consumo de ração nos grupos TgI+plaII, TgI+pctdrII, plaI+pctdrII e plaI+plaII (dados não demonstrados). Além disso, considerando-se as etapas II e III em sequência (Figura 5), não houve influência consistente do *PCTdr* no comportamento alimentar dos animais nos períodos pré- e pós-transplante. Esses resultados demonstram que não houve anorexia, já que os animais mantiveram constância no consumo de ração, com diminuições episódicas na quantidade diária consumida pelo grupo TgI+pctdrII+bmyIII. Esse quadro geral pode ser relacionado, diretamente, com a menor perda de peso observada no

regime PCT $dr$  em relação às altas doses de busulfan e ciclofosfamida no regime PCT (Capítulo 2 desta tese).

Quando aplicados nas doses recomendadas para regimes de mieloablação, os quimioterápicos busulfan e ciclofosfamida provocam uma série de efeitos adversos de relevância clínica nos pacientes (ZENG et al., 2010; SCOTT et al., 2012). Além disso, altas taxas de mortalidade podem ser associadas a altas concentrações de busulfan na corrente sanguínea em pacientes submetidos a imunossupressão farmacológica para transplante alogênico (LJUNGMAN et al., 1997).

Em camundongos fêmeas Balb/c, o PCT com busulfan e ciclofosfamida em doses recomendadas para mieloablação, resulta em quadro clínico grave e mortalidade nos períodos pré- e pós-transplante. Além disso, este efeito é mais precoce em animais portadores de *T. gondii* (Capítulo 2 desta tese). Em comparação a esse cenário, os achados do presente estudo demonstram que a redução das doses dos quimioterápicos no PCT $dr$  foi benéfica à condição clínica dos animais no período de preparação para o transplante alogênico, inclusive nas fêmeas portadoras de *T. gondii*.

Na Figura 6 são demonstrados a frequência e a intensidade dos sinais clínicos durante no período pós-transplante (etapa III), em cada animal, nos grupos experimentais. Em geral, os sinais clínicos apresentados foram classificados como leves. Sinais clínicos moderados foram observados apenas nos grupos submetidos ao PCT $dr$ . Contudo, pode-se destacar que não houve apresentação de sinais clínicos graves em nenhum dos animais. A evolução clínica dos animais após o transplante de células BMy, independentemente de terem sido submetidos à imunossupressão prévia ou de estarem cronicamente infectados por *T. gondii*, não teve quadros graves ou mortalidade. Da mesma forma, não houve mortalidade de animais durante o período em nenhum dos demais grupos, até o dia da eutanásia (7º dia após o transplante).

A variação média diária de peso vivo e a frequência e intensidade dos sinais clínicos dos animais durante a etapa III deste estudo corroboram com o que indicavam os resultados da etapa II (pré-transplante), demonstrando que o PCT $dr$  acarreta poucos efeitos adversos no quadro clínico geral dos animais. Além disso, conforme se demonstra na Figura 6, nenhum dos animais apresentou sinais clínicos graves, e mesmo a frequência de sinais clínicos moderados foi muito baixa ao longo da etapa III deste estudo. Ademais, não houve mortalidade de animais nas etapas II e III.

Após a eutanásia, no final da etapa III, foram encontrados cistos de bradizoítos (Figura 7) na inspeção microscópica dos tecidos encefálicos de todas as fêmeas que receberam o inóculo de *T. gondii* (TgI+plaII+plaIII, TgI+plaII+bmyIII e TgI+pctdrII+bmyIII). Esses

resultados indicam que não houve estímulo (imunossupressão ou imunomodulação) suficiente para levar à reativação da toxoplasmose (FUX et al., 2003; DELLACASA-LINDBERG et al., 2007; DEROUIN & PELLOUX, 2008; AJZENBERG et al., 2009), seja pelo efeito do PCT*dr* ou do transplante de células BMy.

O quadro clínico favorável resultante do PCT*dr*, mesmo em camundongos cronicamente infectados por *T. gondii*, evidencia que a imunossupressão provocada pelo PCT*dr* foi leve. Embora este aspecto possa ser considerado positivo no que diz respeito ao menor risco de disseminação de taquizoítos de *T. gondii*, isso também pode representar que a mieloablação não foi completa (HOFFMANN et al., 2002; NILSSON et al., 2005; RAIOLA et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Com isso, a finalidade do pré-condicionamento, de proporcionar condições mais adequadas para o enxerto de células alogênicas no organismo receptor, pode ficar prejudicada (ROUX et al., 1992).

No entanto, diversos estudos têm sido direcionados a estabelecer regimes de pré-condicionamento ao transplante menos agressivos aos pacientes, ainda que haja certo grau de quimerismo entre as células do receptor e do doador (ROUX et al., 1992; NILSSON et al., 2005; DEEG et al., 2006; ZHAO et al., 2014). Dessa forma, o regime de pré-condicionamento com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT*dr*) pode ser considerado como uma opção em pacientes portadores de toxoplasmose.

## CONCLUSÃO

O regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT*dr*) demonstrou-se seguro para aplicação em camundongos fêmeas Balb/c cronicamente infectados por *T. gondii* (cepa VEG, cistogênica), já que não promoveu a reativação da toxoplasmose nesses animais. O PCT*dr* provocou baixas frequência e incidência de sinais clínicos, e não causou mortalidade de animais. O transplante alogênico de células BMy não causou alterações clínicas graves ou mortalidade, no curto prazo, em fêmeas Balb/c submetidas ao PCT*dr*, independentemente de infecção crônica por *T. gondii* nesses animais.

**AGRADECIMENTOS:** Agradecemos o suporte financeiro da CAPES, com bolsa de doutorado, e do CNPq/FAPERGS (PRONEX - processo 10/0039-3- edital 008/2009), e o apoio técnico do setor de Hematologia/Oncologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM).

## REFERÊNCIAS

AJZENBERG, D. et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v.199, n.8, p.1155-1167, 2009.

BLUME, K.G. et al. A prospective randomized comparison of total body irradiation-etoposide versus busulfan-cyclophosphamide as preparatory regimens for bone marrow transplantation in patients with leukemia who were not in first remission: a Southwest Oncology Group study. **Blood**, v.81, n.8, p.2187-2193, 1993.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n.4, p.438-442, 2002.

CIBICKOVA, L. et al. Cerebral toxoplasmosis in an allogeneic peripheral stem cell transplant recipient: case report and review of literature. **Transplant Infectious Disease**, v.9, n.4, p.332-335, 2007.

DEEG, H.J. et al. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. **Blood**, v.108, n.5, p.1485-1491, 2006.

DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N.; BARRAGAN, A. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. **Microbes and Infection**, v.9, n.11, p. 1291-1298, 2007.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.12, p.1089-1101, 2008.

FLEGR, J.; STRIZ, I. Potential immunomodulatory effects of latent toxoplasmosis in humans. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.274, 2011.

FUX, B. et al. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6392-6401, 2003.

GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, n.2, p.155-159, 2007.

HOFFMANN, P. et al. Donor-type CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.196, n.3, p.389-399, 2002.

INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n.1, p.1-7, 2010.

LJUNGMAN, P. et al. High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. **Bone Marrow Transplantation**, v.20, n.11, p.909-913, 1997.

MEDEIROS, B.C. et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. **Transplant Infectious Disease**, v.3, n.1, p.24-28, 2001.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v.363, n.9425, p.1965-1976, 2004.

NILSSON, C. et al. Effect of altering administration order of busulphan and cyclophosphamide on the myeloablative and immunosuppressive properties of the conditioning regimen in mice. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 3, p. 380-387, 2005.

OLDENHOVE, G. et al. Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 772-786, 2009.

PEZERICO, S.B. et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 2, p. 168-172, 2009.

RAIOLA, A.M. et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.19, n.1, p.117-122, 2013.

RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.1, n.1, p.3-9, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, n.2, p.264-296, 2012.

ROEMER, E. et al. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.e1-e8, 2001.

ROUX, E. et al. Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. **Blood**, v.79, n.10, p.2775-2783, 1992.

SAEIJ, J.P.J. et al. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

SCOTT, L. et al. Intravenous busulfan: a guide to its use as conditioning treatment before transplantation of haematopoietic progenitor cells. **Clinical Drug Investigation**, v.32, n.9, p.641-648, 2012.

TORREY, E. F.; BARTKO, J.J.; YOLKEN, R.H. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. **Schizophrenia Bulletin**, p.sbs043, 2012.

TROPEL, P. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, v.295, n.2, p.395-406, 2004.

VIDAL, J.E. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care STDs**, v.19, p.626-634, 2005.

ZENG, L. et al. Vascular endothelium changes after conditioning in hematopoietic stem cell transplantation: role of cyclophosphamide and busulfan. In: **Transplantation Proceedings**. Elsevier, 2010. p.2720-2724.

ZHAO, X.F. et al. Modified Busulfan and Cyclophosphamide conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of patients with hematologic Malignancies. In: **Transplantation Proceedings**. Elsevier, 2014. p.1531-1535.



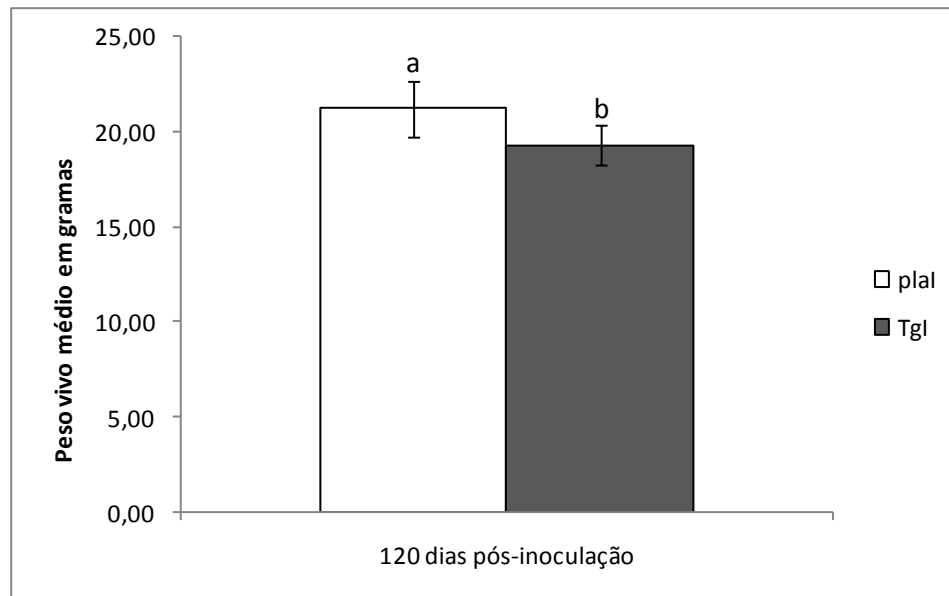


Figura 1. Média de peso vivo de fêmeas Balb/c aos 120 dias pós-inoculação oral de 50 cistos teciduais de *T. gondii* da cepa VEG (grupo TgI) ou de placebo (grupo plal). Letras (a,b) diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

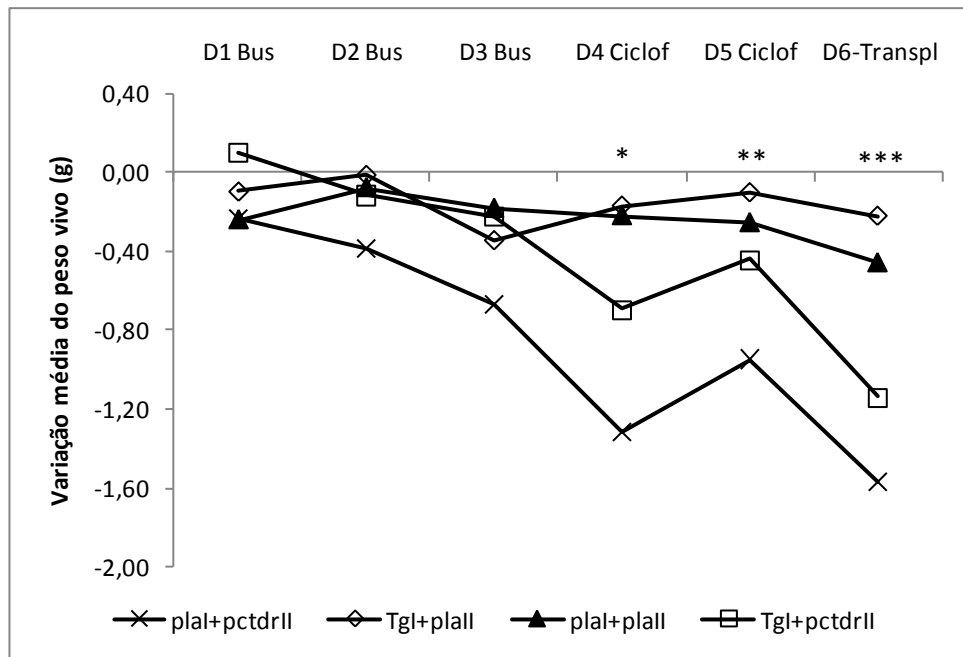


Figura 2. Variação do peso médio de cada animal, por grupo, durante o período do PCTdr (etapa II). TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCTdr na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCTdr). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0,05$ . (\*) O grupo TgI+plaII é diferente do grupo plaI+pctdrII. (\*\*) Os grupos TgI+plaII e plaI+plaII são diferentes do grupo plaI+pctdrII. (\*\*\*) O grupo TgI+plaII é diferente dos grupos TgI+pctdrII e plaI+pctdrII; e o grupo plaI+plaII é diferente do grupo plaI+pctdrII.

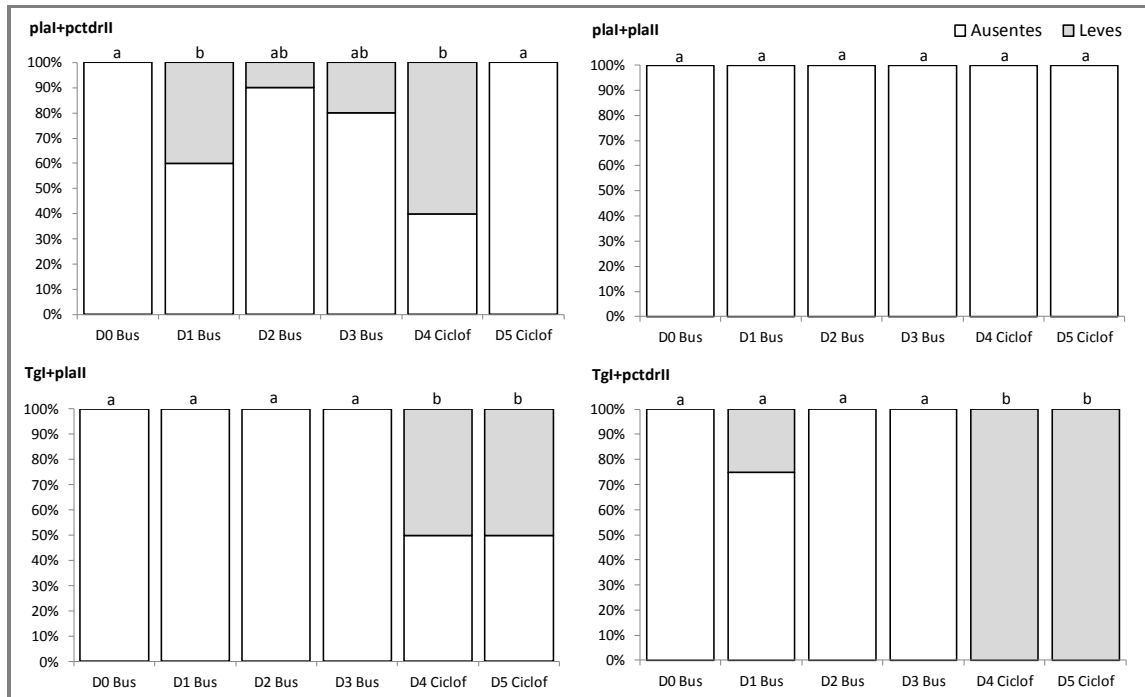


Figura 3. Frequência e intensidade de sinais clínicos durante regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT $dr$ ) em camundongos fêmeas Balb/c infectadas ou livres de infecção por *T. gondii*. TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCT $dr$  na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCT $dr$ ). Nota-se que os sinais clínicos vão de ausentes a leves. Letras diferentes (a,b) indicam frequências diferentes em um mesmo grupo ao longo dos dias, com  $p < 0,05$  pelo teste do qui-quadrado.

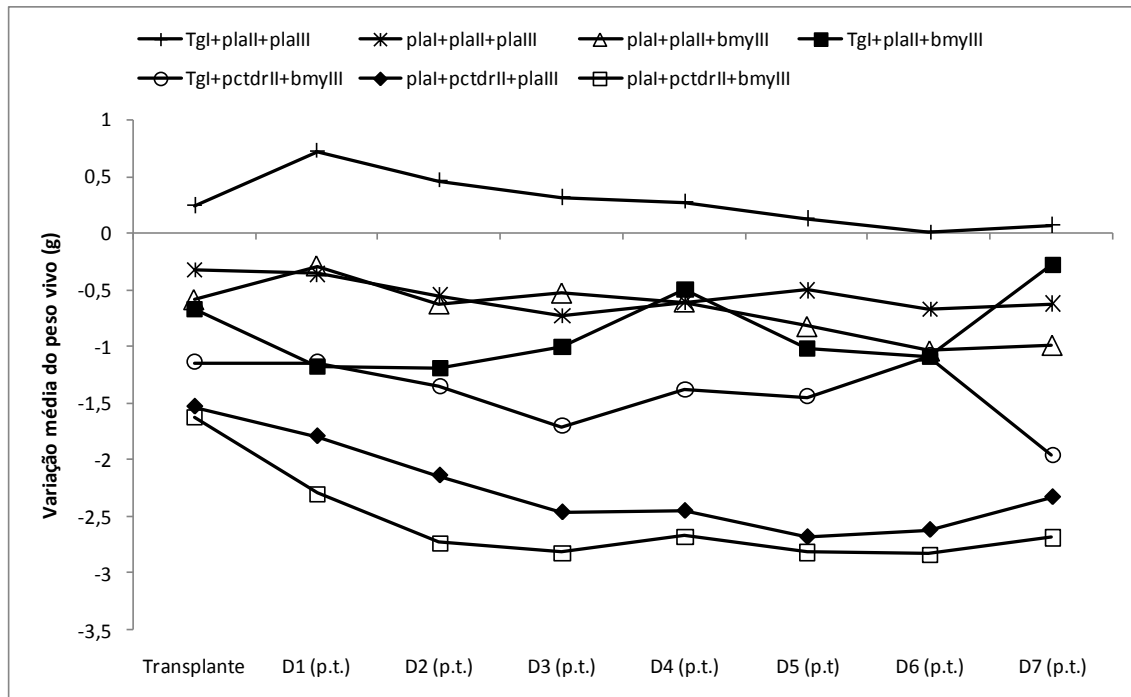


Figura 4. Variação média de peso diária por animal para cada grupo experimental na etapa III, abrangendo o transplante e o período pós-transplante (p.t.). TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCTdr na etapa II; plaI: placebo na etapa I (não-infectadas); plaII: placebo na etapa II (não receberam o PCTdr); bmyIII: receberam transplante de células BMy na etapa III; plaIII: placebo na etapa III (não receberam transplante). (As diferenças estatísticas relativas aos dados apresentados nesta figura encontram-se descritas na Tabela 1, abaixo).

Tabela 1. Descrição e análise estatística da variação média de peso por animal (em gramas) para cada grupo experimental na etapa III do estudo, no período pós-transplante (p.t.).

Grupos	Transpl.	D1 p.t.	D2 p.t.	D3 p.t.	D4 p.t.	D5 p.t.	D6 p.t.	D7 p.t.
TgI+plaII+plaIII	0,24 a	0,72 a	0,46 a	0,31a	0,28ab	0,13 a	0,01 a	0,07 a
plalI+plaII+plaIII	-0,33ab	-0,36ab	-0,55ab	-0,73ab	-0,61ab	-0,51 a	-0,67 a	-0,62 a
plalI+plaII+bmyIII	-0,59ab	-0,30ab	-0,63ab	-0,54ab	-0,61ab	-0,83 a	-1,04 a	-0,99 ab
TgI+plaII+bmyIII	-0,68abc	-1,19bc	-1,20bc	-1,01abc	-0,50ab	-1,03 a	-1,10 a	-0,29 a
TgI+pctdrII+bmyIII	-1,14bc	-1,14bc	-1,36bc	-1,71bcd	-1,39bc	-1,45ab	-1,09 a	-1,96bc
plalI+pctdrII+plaIII	-1,54c	-1,80c	-2,14cd	-2,47c	-2,45c	-2,68b	-2,62 b	-2,33c
plalI+pctdrII+bmyIII	-1,63c	-2,30c	-2,74d	-2,82d	-2,67c	-2,82b	-2,83 b	-2,68c

Letras diferentes na mesma coluna (a, b, c, d) indicam diferença significativa na variação média do peso diário entre os grupos pelo teste de Tukey-Kramer com  $p < 0,05$ .

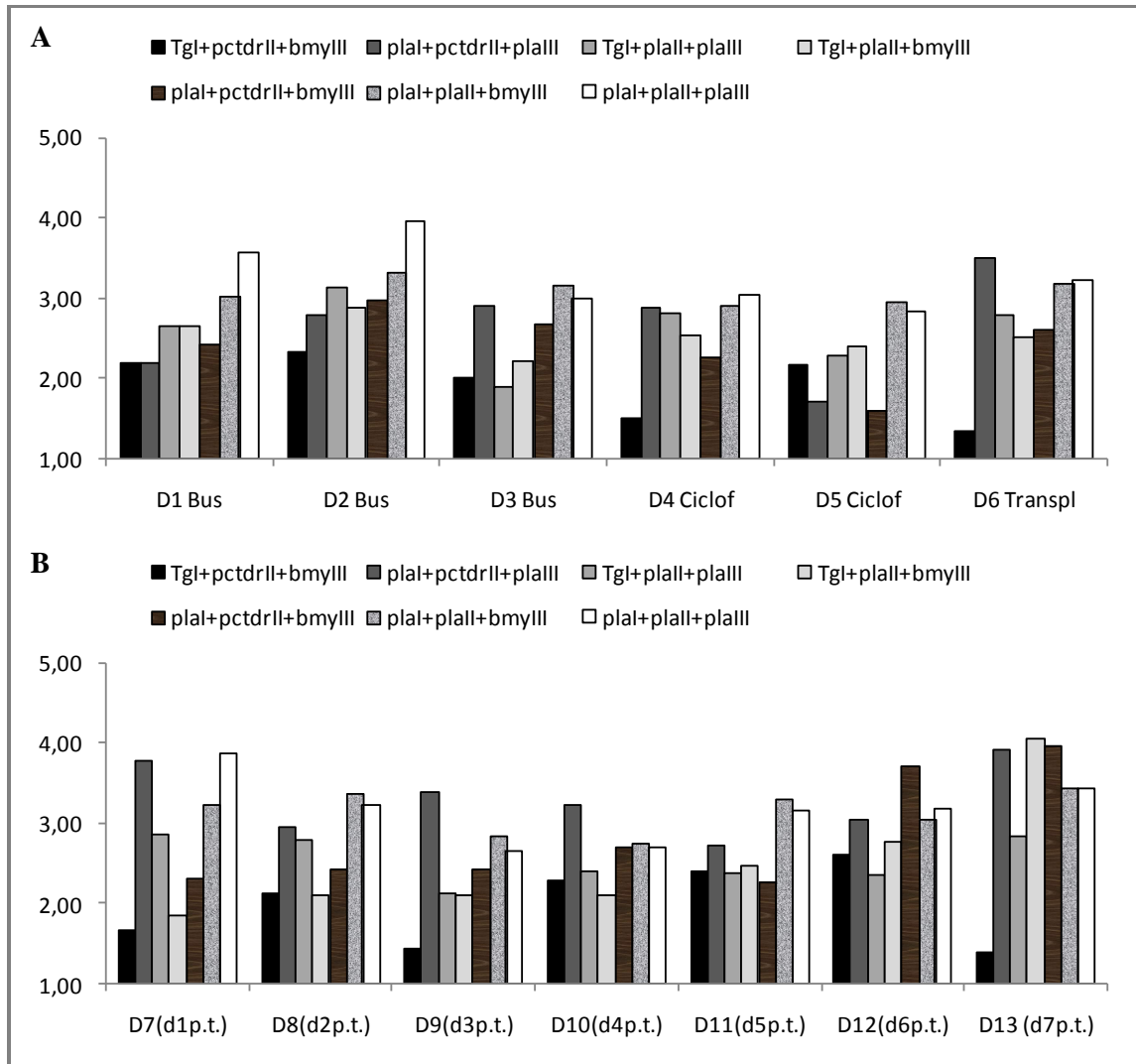


Figura 5. Consumo médio diário de ração por animal para cada grupo experimental da etapa III, considerando-se: (A) o histórico dos animais no pré-transplante; e (B) o período pós-transplante (p.t.). TgI: infectadas na etapa I; pctdrII: submetidas ao PCT $dr$  na etapa II; plalI: placebo na etapa I (não-infectadas); plalII: placebo na etapa II (não receberam o PCT $dr$ ); bmyIII: receberam transplante de células BMy na etapa III; plalIII: placebo na etapa III (não receberam transplante). Nota-se que o padrão de consumo se mantém sem alterações dignas de nota. Exceto por reduções transitórias no grupo TgI+pctdrII+bmyIII.

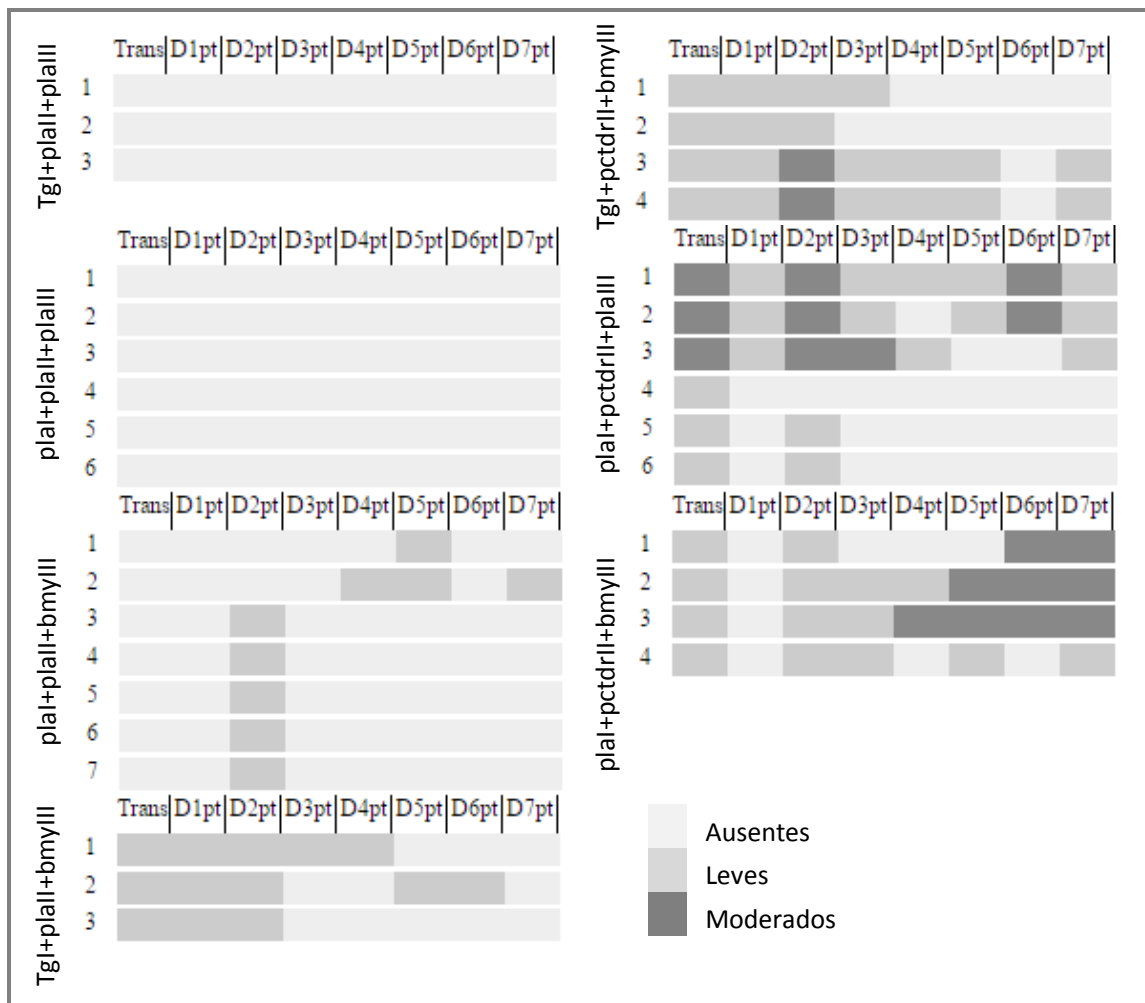


Figura 6. Frequência e intensidade de sinais clínicos, individualizadas por animal, em cada grupo experimental de camundongos Balb/c fêmeas durante o período pós-transplante (etapa III). A intensidade do matiz representa a intensidade dos sinais clínicos.

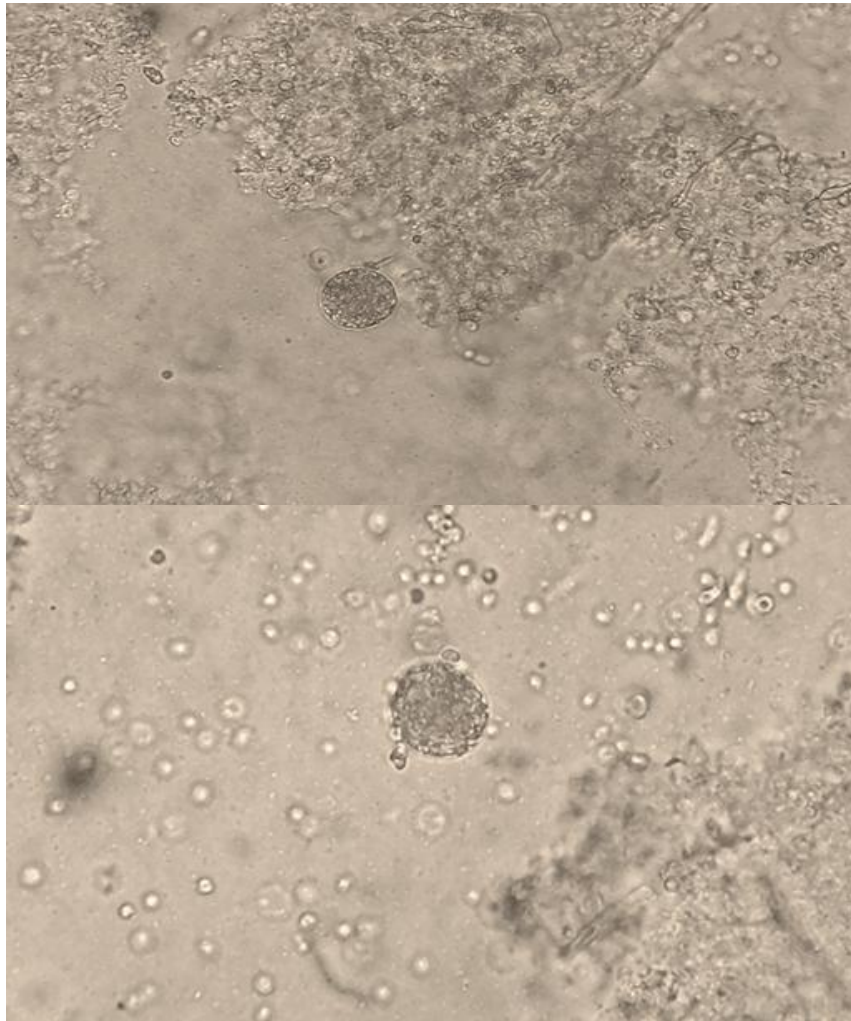


Figura 7. Cistos de bradizoítos (estruturas esféricas ao centro, em destaque) encontrados em lâminas de tecidos encefálicos de camundongos fêmeas Balb/c cronicamente infectadas com *T. gondii* da cepa VEG (cistogênica). Aumento de 200x.

## 6. CONCLUSÕES

O diagnóstico molecular de presença ou ausência de células alogênicas no sangue e em tecidos pulmonares de camundongos fêmeas Balb/c pode ter sensibilidade baixa, mesmo utilizando-se a PCR. A *nested*-PCR apresentada neste estudo aumentou a segurança do diagnóstico molecular da presença ou ausência de células alogênicas, derivadas de camundongos machos doadores, em amostras de sangue e de tecidos de fêmeas, que receberam essas células por transplante endovenoso.

A inclusão de um *set* adicional de *primers* na primeira etapa da PCR (multiplex), que serviu como controle interno da reação para cada amostra de DNA, bem como a realização da segunda etapa da PCR (*nested*), foram importantes para minimizar o risco de ocorrência de resultados falso-negativos no diagnóstico molecular na terapia celular alogênica, com vantagem sobre a PCR simples. A técnica de diagnóstico molecular descrita neste estudo pode ser aplicável a diferentes tipos de células como as CTA, as CTE e as CFMO.

O regime de pré-condicionamento para o transplante alogênico com busulfan e ciclofosfamida em doses recomendadas para mieloablação (PCT) esteve associado, diretamente, ao agravamento do quadro clínico geral de camundongos fêmeas, com altas taxas de mortalidade. Entretanto, esse efeito foi notavelmente precoce nos animais cronicamente infectados por *T. gondii*, demonstrando o risco da combinação entre a infecção por *T. gondii* e a imunossupressão farmacológica.

O transplante alogênico macho-fêmea de células da fração mononuclear da medula óssea (células BMy), pela via endovenosa (sistêmica), apresenta total segurança no curto prazo. Clinicamente, não se observam efeitos indesejáveis das células transplantadas, independentemente da presença ou ausência de infecção por *T. gondii*, desde que os animais não tenham sido submetidos ao PCT.

A utilização de um regime de pré-condicionamento com doses reduzidas de busulfan e ciclofosfamida (PCT<sub>dr</sub>) apresenta elevada segurança para aplicação em camundongos fêmeas Balb/c cronicamente infectadas por *T. gondii* cistogênica (cepa VEG). O PCT<sub>dr</sub> diminui a incidência de sinais clínicos e não provoca mortalidade de animais, diferentemente de PCT com altas doses de busulfan e ciclofosfamida, recomendadas para mieloablação. O transplante de células BMy alogênicas foi clinicamente seguro no curto prazo em fêmeas Balb/c submetidas ao PCT<sub>dr</sub>, independentemente de infecção persistente por *T. gondii*.



## 7. REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D. et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v.199, n.8, p.1155-1167, 2009.
- AMIT, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental Biology**, v.227, n.2, p.271-278, 2000.
- ANDERSON, M.E. et al. Embryonic stem cell--derived cardiac myocytes are not ready for human trials. **Circulation Research**, 2014. (ahead of print).
- ATALA, A. Human embryonic stem cells: early hints on safety and efficacy. **The Lancet**, v.379, n.9817, p.689-690, 2012.
- BEN-DAVID, U.; BENVENISTY, N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Nature Reviews Cancer**, v.11, n.4, p.268-277, 2011.
- BLUM, B. et al. The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v.27, p.281-287, 2009.
- BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.18, n.6, p.827-842, 2004.
- BOSCH-DRIESSEN, L. et al. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. **Ophthalmology**, v.109, n.5, p.869-878, 2002.
- BOYER, K. M. et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.192, n.2, p.564-571, 2005.
- BRADLEY, A. Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.2, n.6, p.1013-1017, 1990.
- BRZOSKA, M. et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.330, p.142-150, 2005.
- BUNNELL, B.; BETANCOURT, A.; SULLIVAN, D. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v.1, p.1-8, 2010.
- BUXTON, D. et al. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.25-28, 2007.
- CANER, A. et al. Determining *Toxoplasma* high-risk autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients by systematic pre-transplant PCR screening of stem cell originated buffy coat. **Parasitology International**, v.61, n.4, p.565-571, 2012.

CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Resesearch**, v.9, p.641-650, 1991.

CARR, A.J.F. et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. **Trends in Neurosciences**, v.36, n.7, p.385-395, 2013.

CHANDRASEKAR, P. H.; MOMIN, F. Disseminated toxoplasmosis in marrow recipients: a report of three cases and a review of the literature. Bone marrow transplant team. **Bone Marrow Transplantation**, v.19, n.7, p.685-689, 1997.

CHONG, J.JH et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. **Nature**, 2014.

CHUNG, Y. et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. **Nature**, v.439, n.7073, p.216-219, 2005.

CIBICKOVA, L. et al. Cerebral toxoplasmosis in an allogeneic peripheral stem cell transplant recipient: case report and review of literature. **Transplant Infectious Disease**, v.9, n.4, p.332-335, 2007.

COLLINS, C.A. et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**, v.122, n.2, p.289-301, 2005.

DEANS, R.; MOSELEY, A. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p.875-884, 2000.

DEEG, H.J. et al. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. **Blood**, v.108, n.5, p.1485-1491, 2006.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.12, p.1089-1101, 2008.

DRUKKER, M. et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. **Stem Cells**, v.24, n.2, p.221-229, 2006.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep - The last 20 years. **Veterinary parasitology**, v.163, n.1, p.1-14, 2009.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, p.1257-1278, 2008.

ENGLISH, A. et al. A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. **Rheumatology**, v.46, p.1676-1683, 2007.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, n.5819, p.154-156, 1981.

FLEGR, J.; STRIZ, I. Potential immunomodulatory effects of latent toxoplasmosis in humans. **BMC Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.274, 2011.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem Cells: Review A New Lease on Life. **Cell**, v.100, p.143-155, 2000.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v.116, n.6, p.769-778, 2004.

GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, n.2, p.155-159, 2007.

GRATWOHL, A. et al. Female donors influence transplant-related mortality and relapse incidence in male recipients of sibling blood and marrow transplants. **The Hematology Journal**, v.2, n.6, p.363-370, 2001.

GRUENLOH, W. et al. Characterization and in vivo testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v.17, p.1517-1525, 2011.

HABEK, M. et al. Unusual cause of dementia in an immunocompetent host: toxoplasmic encephalitis. **Neurological Sciences**, v.30, n.1, p.45-49, 2009.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

HIGASHI, Y. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. **Circulation**, v.109, n. 0, p. 215-1218, 2004.

HOHLFELD, P. et al. Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. **The Journal of Pediatrics**, v.115, n.5, p.765-769, 1989.

HORWITZ, E.M. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.13, p.8932-8937, 2002.

INABA, S.; EGASHIRA, K.; KOMORI, K. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis?. **The Lancet**, v.360, n.9350, 2002.

INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n.1, p.1-7, 2010.

INNES, E.A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases**, v.20, p.131-138, 1997.

JOHE, K.K. et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. **Genes & development**, v.10, n.24, p.3129-3140, 1996.

KAMIHATA, H. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. **Circulation**, v.104, n.9, p.1046-1052, 2001.

KAPPERUD, G. et al. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy Results of a Prospective Case-Control Study in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v.144, n.4, p.405-412, 1996.

KARNOUB, A. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. **Nature**, v.449, p.557-565, 2007.

KLIMANSKAYA, I. et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. **Nature**, v.444, n.7118, p.481-485, 2006.

KLYUSHNENKOVA, E. et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal of Biomedical Science**, v.12, n.1, p.47-57, 2005.

KONUMA, T. et al. Comparable Long-Term Outcome of Unrelated Cord Blood Transplantation with Related Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients Aged 45 Years or Older with Hematologic Malignancies after Myeloablative Conditioning. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, 2014.

LAKSHMIPATHY, U; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, v.19, n.1, p.29-38, 2005.

LALU, M.M. et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **PLOS One**, v.7, n.10, p.e47559, 2012.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, v.262, n.5, p.509-525, 2007.

LEE, A.S. et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. **Nature Medicine**, v.19, n.8, p.998-1004, 2013.

LU, B. et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. **Stem Cells**, v.27, n.9, p.2126-2135, 2009.

LUND, R.D. et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. **Cloning and Stem Cells**, v.8, n.3, p.189-199, 2006.

MALGIERI, A. et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **International journal of clinical and experimental medicine**, v.3, n.4, p.248, 2010.

MARTINO, R. et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem transplantation. Report of a 5-year survey from the infectious diseases working party of the european group for blood and marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v.25, n.10, p.1111-1114, 2000.

- MEDEIROS, B.C. et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. **Transplant Infectious Disease**, v.3, n.1, p.24-28, 2001.
- MEISEL, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v.103, n.12, p.4619-4621, 2004.
- MINGUELL, J. et al. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, p.507-520, 2001.
- MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. In: **Engineering of stem cells**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p.185-199.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v.363, n.9425, p.1965-1976, 2004.
- MOORE, K.; LEMISCHKA, I. Stem cells and their niches. **Science**, v.311, p.1880-1885, 2006.
- MORRISON, S.J.; SCADDEN, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v.505, n.7483, p.327-334, 2014.
- NAUTA, A.J. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, v.108, n.6, p.2114-2120, 2006.
- PISCAGLIA, A. Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, p.4273-4279, 2008.
- PRESTON, S. et al. The new stem cell biology: something for everyone. **Molecular Pathology**, v.56, p.86-96, 2003.
- PUISSANT, B. et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v.129, n.1, p.118-129, 2005.
- RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.19, p.1-22, 2003.
- RAIOLA, A.M. et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.19, n.1, p.117-122, 2013.
- RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.1, n.1, p.3-9, 2011.
- RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v.312, p.2169-2179, 2006.

- REUBINOFF, B.E. et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nature Biotechnology**, v.18, n.4, p.399-404, 2000.
- REYNOLDS, J.; LAMBA, D.A. Human embryonic stem cell applications for retinal degenerations. **Experimental Eye Research**, v.123, p.151-160, 2014.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, n.2, p.264-296, 2012.
- ROBERTS, T. et al. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, n.2, p.249-256, 1990.
- ROEMER, E. et al. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.e1-e8, 2001.
- ROJAS, M. et al. Bone marrow–derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.33, n.2, p.145-152, 2005.
- RYNING, F.W. et al. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v.90, n.1, p.47-49, 1979.
- SCHULDINER, M. et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.21, p.11307-11312, 2000.
- SCHWARTZ, S.D. et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. **The Lancet**, v.379, n.9817, p.713-720, 2012.
- SEEGER, F.H. et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v.28, n.6, p.766-772, 2007.
- SHI, Y. et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research**, v.20, p.510-518, 2010.
- SIEGEL, S.E. et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. **Blood**, v.37, n.4, p.388-394, 1971.
- SHICHINOHE, H. et al. Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? **Neuropathology**, v.30, p.113-122, 2010.
- SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.17, p.435-462, 2001.
- SPRADLING, A; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T.. Stem cells find their niche. **Nature**, v.414, n.6859, p.98-104, 2001.

TATEISHI-YUYAMA, E. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. **The Lancet**, v.360, n.9331, p.427-435, 2002.

THOMSON, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-1147, 1998.

TOLAR, J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.25, p.371-379, 2007.

TOMA, J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v.3, p.778-784, 2001.

TORREY, E. F.; BARTKO, J.J.; YOLKEN, R.H. Toxoplasma gondii and other risk factors for schizophrenia: an update. **Schizophrenia Bulletin**, p.sbs043, 2012.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European Journal of Immunology**, v.36, p.2566-2573, 2006.

VERDIJK, R.B. et al. Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. **Blood**, v.103, p.1961-1964, 2004.

VIDAL, J.E. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care STDs**, v.19, p.626-634, 2005.

VOGEL, G. Can adult stem cells suffice?. **Science**, v. 292, n. 5523, p. 1820-1822, 2001.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v.116, n.5, p.639-648, 2004.

WALLON, M. et al. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **BMJ**, v.318, p.1511-1514, 1999.

YOUNG, H.E.; BLACK JR, A.C. Adult stem cells. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 276, n. 1, p. 75-102, 2004.