

LAYRA LUCY MARIA ALBUQUERQUE DA COSTA

**MIELOPOESE EM CAMUNGONGOS
GENETICAMENTE SELECIONADOS PARA ALTA
OU BAIXA REATIVIDADE INFLAMATÓRIA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LAYRA LUCY MARIA ALBUQUERQUE DA COSTA

**MIELOPOESE EM CAMUNGONGOS
GENETICAMENTE SELECIONADOS PARA ALTA
OU BAIXA REATIVIDADE INFLAMATÓRIA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

**São Paulo
2008**

*À minha mãe, Maria Albuquerque, em memória, eu dedico esta dissertação.
Você permanece presente no meu coração, ocupando um lugar especial nos
meus pensamentos. Obrigada por tudo!*

Apoio financeiro: Fapesp/ CNPq

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, pela amizade, dedicação, prazer em ensinar e formar os seus alunos. Por ser meu exemplo de dedicação e profissionalismo. Pelo seu incentivo e força ao longo desta caminhada, que me ajudaram a nunca desanimar e ser perseverante, contribuindo enormemente com o meu amadurecimento profissional e pessoal. Você tem um lugar especial no meu coração.

Á Dra. Wafa Cabrera pela ajuda imprescindível neste trabalho, pelo carinho e convivência.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética: Dra. Olga Ibañez, Dr. Marcelo De Franco, Dra. Nancy Starobinas, Dra. Solange Massa, Dra. Milene De Franco, Dra. Solange Carbonare, pela colaboração com este trabalho, pelo incentivo e contribuição intelectual.

Aos meus amigos do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan: Débora, Iana, Alessandra por estarem sempre prontas a ajudar nos experimentos, ao Cristiano por toda ajuda, principalmente na caracterização morfológica, a Tatiane, Andrea Arruda, Patrícia, Luciana, Andrea Borrego, Ludmila, Vinícius, Fran, Simone, Talita e Jussara. Minha enorme gratidão por toda a todos vocês pela ajuda, pela convivência maravilhosa e pela amizade. Vocês tornam o meu dia mais feliz.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética: Sandra Ottoboni, Neusa Miranda, Marinalva Lima, Tânia e Ronaldo, pelo agradável convívio e pela preparação de todos os materiais utilizados.

Ao meu pai e sua esposa, pelo amor, carinho e apoio.

Á minha mãe, por sempre acreditar e confiar em mim. Por ter feito todos os esforços possíveis para que eu pudesse realizar os meus sonhos profissionais. Não existem palavras para descrever a sua importância nas decisões da minha vida. Seu exemplo e sua determinação me fizeram forte e capaz de lutar pelo acredito.

Aos irmãos maiores, William e Lair, pelo amor, paciência, carinho e pelo enorme apoio. Vocês são a minha luz. E aos irmãos menores, Manuela e Vítor, por serem uns anjinhos. Obrigado pelo interminável incentivo e apoio e principalmente pelo amor que me dá forças para continuar.

A minha tia Graça, por ser um anjo em forma de gente. Sua força e sua bondade me contagia.

As demais pessoas que de alguma forma me ajudaram, rezando, orando e torcendo por mim. Todos estão no meu coração de uma maneira muito especial.

**“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”**

(Bertold Brecht)

RESUMO

ALBUQUERQUE, L. L. **Mielopoese em camundongos geneticamente selecionados para alta e baixa reatividade inflamatória aguda.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A mielopoese é um processo de expansão e diferenciação de precursores em monócitos e granulócitos maduros mediado pela combinação de genes e fatores de transcrição que atuam em estágios específicos deste processo. Camundongos geneticamente selecionados para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda exibem diferenças significativas no número médio de leucócitos migrantes e no conteúdo protéico do exsudato inflamatório produzido por partículas de poliacrilamida (biogel). A diferença fenotípica interlinhagens, resultante deste tratamento, é de 25 vezes a favor dos animais AIRmax no infiltrado celular, com representação predominante de polimorfonucleares e 2,5 na concentração protéica. Esta maior capacidade inflamatória da linhagem AIRmax é decorrente de três fatores preponderantes: Maior produção quantitativa de fatores quimiotáticos, resistência dos neutrófilos infiltrados à apoptose e maior produção de neutrófilos pela medula óssea. Esta diferença na capacidade inflamatória das linhagens AIRmax e AIRmin reflete, respectivamente, na resistência e susceptibilidade a infecções e desenvolvimento de tumores quimicamente induzidos. Assim, considerando a diferente capacidade de produção leucocitária, entre as linhagens AIRmax e AIRmin, nos propomos a estudar comparativamente nestas linhagens, o processo de diferenciação mielocítica, a expressão gênica e a presença de proteínas celulares no curso da diferenciação *in vitro*. Para tanto, utilizamos sistema de proliferação das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin normais por meio da adição de GM-CSF associado ou não ao ATRA. Verificamos que as células da medula óssea dos animais AIRmax apresentaram maior potencial proliferativo, contendo majoritariamente células mielóides em estágios de diferenciação que precedem a maturação neutrofílica, do que nos animais AIRmin. Além disso foi constatado maiores níveis de expressão gênica nos animais AIRmax em genes envolvidos nos estágios iniciais da mielopoese, tais como: c-myb, PU.1 e MPO. O conteúdo protéico das células em cultura revelou diferenças quantitativas e qualitativas de proteínas provavelmente envolvidas no processo de mielopoese nas linhagens AIRmax e AIRmin. Desta forma, buscamos esclarecer em conjunto com os resultados de proliferação, diferenciação celular, expressão gênica e protéica os possíveis mecanismos de mielopoese operantes nestas linhagens.

Palavras-chave: Mielopoese; Camundongos; Diferenciação celular; Medula óssea.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, L. L. **Myelopoiesis in mice genetically selected for high or low acute inflammatory response.** 2008. 101 f. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Myelopoiesis is a process of precursor cell expansion and differentiation mediated by a combination of genes and transcription factors that act in specific stages of this process. Mice genetically selected for high or low acute inflammatory response exhibit significant differences in the average number of migrating leukocytes and in the protein content of inflammatory exudate produced by polyacrylamide particles (biogel). The phenotypic interline difference, resulting from this selection, is of 25-fold in favor of AIRmax mice in the number of infiltrated cells with predominance of polymorfonuclear cells and 2.5-fold in the protein concentration. This higher inflammatory capacity of the AIRmax mice is due to three convergent factors: higher local production of chemotactic factors, increased resistance of locally infiltrated neutrophils to spontaneous apoptosis and larger production of mature neutrophils by the bone marrow. These alterations resulting from the selection of AIRmax and AIRmin reflected in the resistance and susceptibility, respectively, of the two mouse lines to infections and to the development of chemically induced tumors. Thus, considering the differential capacity of leukocyte production between AIRmax and AIRmin mice, we are studying comparatively the myelocytic differentiation process, considering the gene and proteins expression during cellular differentiation *in vitro*. We used a system of liquid culture to study the bone marrow (BM) cells proliferation through the addition of GM-CSF associated to all-trans retinoic acid (ATRA). We verified that the BM cells of AIRmax mice showed higher proliferation levels, containing myeloid cells in different stages of differentiation that precede the neutrophil maturation. In addition by qPCR technique it was verified a larger expression of genes involved in the initial stages of myelopoiesis in the AIRmax BM cultures, such as c-myb, PU.1 and MPO. The analysis of BM cellular protein content by 2D gel electrophoresis revealed quantitative and qualitative differences between two mouse lines. Hence it follows that the differential myeloid cell production in AIRmax e AIRmin mice is due to different gene expression and protein production relevant to myeloid differentiation.

Key words: Myelopoiesis, Mice; Differentiation cellular; Bone marrow.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIR** – Resposta inflamatória aguda
- ATRA** – Ácido Retinóico all trans
- BC** - Bastonetes
- cDNA** – DNA complementar
- C/EBP** (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*)
- CLP** - (*Common Lymphoid Progenitors*)
- CMP** – (*Common Myeloid Progenitors*)
- DMBA** - 7,12 – dimetilbenzatraceno
- FITC** – (*Fluorescein Isothiocyanate*)
- GMP** – (*Granulocyte-macrophage progenitor*)
- G-CSF** - fator estimulante de crescimento de granulócitos
- G-CSFR** - Receptor do fator estimulante de crescimento de granulócitos
- GM-CSF** – fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos
- GM-CSFR** - Receptor do fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos
- HSC** - Célula -tronco hematopoética
- H₂O₂** - Peróxido de Hidrogênio
- IL-3R α** - Receptor α da interleucina 3
- MCP-1** (*Monocyte chemoattractant Protein- 1*)
- IPG** – (*Immobilized pH gradient*)
- MB** – Mieloblastos
- MC** - Mielócitos
- MCP-2** - (*Monocyte chemoattractant Protein- 2*)
- M-CSF** – fator estimulante de crescimento de macrófagos
- M-CSFR** - Receptor do fator estimulante de crescimento de macrófagos
- MEP** – (*Megakaryocyte-erythroid progenitors*)
- MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- MIP-1 α** (*Macrophage Inhibitory protein - 1 α*)
- MM** - Metamielócitos
- MMP-8** – Matrix Metaloproteinase - 8
- MMP-9** – Matrix Metaloproteinase – 9
- MMP-25** – Matrix Metaloproteinase - 25

MO – Medula Óssea

MPO - Mieloperoxidase

NE - elastase de neutrófilos

NK - Células matadoras naturais (*Natural Killer*)

O₂⁻ - ânion superóxido

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – (*Phycoerithrin*)

PM - Promielócitos

PMN – Polimorfonucleares

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

QTL – (*Quantitativ Trait Loci*)

RARs - Receptores de ácido retinóico

RARE - Elemento responsivo ao ácido retinóico

RNA_m – RNA mensageiro

RXRs - Receptores X retinóicos

SCF – Fator de célula -tronco

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

TBE – Tampão Brometo de Etídeo

TPA - 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

TPO – Trombopoietina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Representação da expressão de genes e fatores de transcrição em estágios distintos da mielopoese. Biossíntese dos grânulos e proteínas dos grânulos dos neutrófilos.....27
- FIGURA 2** – Divergência da celularidade e da concentração protéica, no processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin, até a 30ª geração.....30
- FIGURA 3** – Resposta proliferativa das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin a doses variadas de GM-CSF e ATRA, após 3, 5 e 7 dias de cultura48
- FIGURA 4** – Caracterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin pela marcação CD11b/GR1 após 3, 5 e 7 dias de cultura estimulada com 50ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a 10^{-7} M.....51
- FIGURA 5** – Caracterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin pela marcação CD38/GR1 após 3, 5 e 7 dias de cultura estimulada com 50ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a 10^{-7} M.....54
- FIGURA 6** – Histograma da expressão de CD38 nas células da medula óssea, cultivadas por 3, 5 e 7 dias, dos camundongos AIRmax e AIRmin.....55
- FIGURA 7** – Morfologia e contagem diferencial das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin em resposta a 50ng de GM-CSF e GM-CSF+ATRA a 10^{-7} M após 3, 5 e 7 dias de cultura.....58
- FIGURA 8** – Expressão relativa do gene c-myb, MPO e PU.1 nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin em resposta a 50ng de GM-CSF ou 50ng de GM-CSF+ATRA 10^{-7} M após 3, 5 e 7 dias de cultura.....62
- FIGURA 9** – Expressão relativa dos genes CEBPa, CD11b, RARa e MMP-9 nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin em resposta a 50ng de GM-CSF e 50ng de GM-CSF+ATRA 10^{-7} M após 3, 5 e 7 dias de cultura.....63
- FIGURA 10** – Eletroforetograma em duas dimensões (2DE) de 40µg de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, obtidas após 3 dias do estímulo *in vitro* com GM-CSF associado ao ácido retinóico.....66
- FIGURA 11** – Eletroforetograma em duas dimensões (2DE) de 100µg de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin obtidas após 5 dias do estímulo *in vitro* com GM-CSF associado ao ácido retinóico.....69

FIGURA 12 – Eletroforetograma em duas dimensões (2DE) de 100µg de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin obtidas após 7 dias do estímulo *in vitro* com GM-CSF associado ao ácido retinóico.....72

FIGURA 13 – Eletroferotograma em duas dimensões (2DE) de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após 3, 5 e 7 dias de cultura do estímulo *in vitro* com 50ng de GM-CSF sozinho.....74

FIGURA 14 – Resposta proliferativa, caracterização fenotípica e histograma da expressão de CD123 das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin após 5 dias de cultura, em resposta a combinações de citocinas hematopoéticas77

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Seqüência de primers para utilização em qPCR.....61
- TABELA 2** - Valores de intensidade, área e volume dos *spots* dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 3 dias, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa Melanie®.....67
- TABELA 3** - Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 3 dias na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).....68
- TABELA 4** - Valores de intensidade, área e volume dos *spots* dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 5 dias, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa Melanie®.....70
- TABELA 5** - Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 5 dias na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).....71
- TABELA 6** - Valores de intensidade, área e volume dos *spots* dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 7 dias, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa Melanie®.....73
- TABELA 7** - Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por 7 dias na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).....73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Camundongos	37
3.2 Cultura em meio líquido das células da Medula Óssea	37
3.3 Avaliação da proliferação celular	37
3.4 Citometria de fluxo	38
3.5 Extração de RNA	38
3.6 Obtenção do DNA complementar (cDNA)	39
3.7 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real	39
3.8 Cálculo da expressão relativa	40
3.9 Quantificação do conteúdo protéico total das células da medula óssea. ..	41
3.10 Análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE de duas dimensões (2D). ...	42
3.11 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata	42
3.12 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Cinética e Dose-Resposta da proliferação <i>in vitro</i> das células da medula óssea cultivadas sob estímulo de GM-CSF e Ácido Retinóico	45
4.1.1 Caracterização das populações celulares da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin durante o processo de mielopoese <i>in vitro</i>.	49
4.1.2 Análise morfológica das células da MO após tempos variados do estímulo com GM-CSF associado ou não ao ATRA.	56
4.2 Expressão Gênica	59
4.2.1 Avaliação da eficiência dos <i>primers</i> utilizados no estudo de expressão gênica	59
4.2.2 Expressão do RNA mensageiro	59
4.3 Análise eletroforética em 2 dimensões das proteínas obtidas das culturas de células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin	64
4.4 Proliferativa <i>in vitro</i> das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin em resposta a diferentes citocinas hematopoiéticas.	75
5 DISCUSSÃO	78

6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A imunidade inata é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo, presente em todos os organismos multicelulares e com a função de prover a primeira linha de defesa contra muitos microorganismos patogênicos. Os principais mecanismos efetores desta resposta são os peptídeos antimicrobianos, os fagócitos e a via alternativa do complemento. Estes são imediatamente ativados após a entrada de um agente infeccioso, de maneira a controlar a replicação do patógeno até que seja desencadeada uma resposta imune adaptativa. De forma geral, o sistema imune inato desempenha um papel essencial na regulação de todos os aspectos da imunidade, sendo que a inibição ou eliminação de qualquer um dos vários mecanismos desta resposta aumenta a susceptibilidade a infecções, mesmo quando o sistema imune adaptativo permanece intacto e funcional (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

As principais células efetoras da imunidade inata são os neutrófilos, os macrófagos e as células matadoras naturais (NK). Os macrófagos e os neutrófilos fagocíticos realizam a defesa contra as bactérias por meio de receptores de superfície que são capazes de reconhecer e ligar constituintes comuns a muitas superfícies microbianas, os PAMPs (do inglês: pathogen-associated molecular patterns). Estas células da imunidade inata secretam citocinas e quimionas que atraem os neutrófilos e os monócitos na corrente sanguínea, e estimulam uma resposta inflamatória aguda (AIR)(LAWRENCE et al., 2002; GORDON, 2002).

A inflamação é uma reação não específica da imunidade inata que inicialmente, comporta-se como uma reação benéfica dos tecidos vascularizados à agressões físicas, químicas e biológicas. É um processo dinâmico, cuidadosamente regulado e necessário para a vigilância imune, reparo e regeneração tecidual após a injúria (MOULIN et al., 1990; HART, 2002).

Fatores solúveis como histamina e cininas promovem mudanças no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular produzindo os sinais clássicos da inflamação descritos por *Cornelius Celsus*: *dor, rubor, calor e edema*.

Uma rede complexa de mediadores solúveis liberados após estímulo inflamatório atua no estabelecimento das condições fisiológicas ideais para que ocorra a migração de células para o sítio da injúria. O extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) ocorre

através de três passos coordenados: rolamento de leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firme às células endoteliais e, finalmente, a transmigração para o acúmulo nos sítio de injúria. Todos os leucócitos podem responder aos sinais de ativação pela alteração da composição, expressão e/ou atividades funcionais das suas moléculas de tráfico. Os neutrófilos e macrófagos expressam moléculas de adesão abundantes para a ligação aos receptores nas células endoteliais ativadas induzidas pela inflamação.

Os neutrófilos, também chamados de polimorfonucleares (PMN), são o principal tipo celular nas fases iniciais da resposta inflamatória seguido pelo influxo de monócitos, que rapidamente se diferenciam em macrófagos. Estas duas células fagocíticas da imunidade inata desenvolvem-se a partir de precursores na medula óssea (MO) e a migração durante uma injúria ocorre em poucas horas no caso dos neutrófilos e mais tardiamente no caso dos macrófagos que ocorre em torno de 72 a 96 horas.

A velocidade de produção destas células na MO, durante a homeostasia, depende da vida média da população circulante a qual pode ser alterada por processos patológicos em que o componente inflamatório seja relevante. Nestas condições patológicas, ocorre a liberação massiva dos fagócitos estocados na MO em resposta à injúria tecidual (BERLINER, 1998; LEKSTROM-HIMES, 2001; BASKARAN et al., 2000; LINK, 2005).

Diferentemente dos linfócitos, os granulócitos e monócitos não podem recircular, mas migram da corrente sanguínea diretamente para a região lesionada em resposta a mudanças moleculares da superfície interna dos vasos e do microambiente (SPRINGER, 1995).

Uma vez no sítio inflamatório, os fagócitos reconhecem, ingerem e destroem vários patógenos, além de produzirem diversos produtos tóxicos que auxiliam na eliminação do microorganismo englobado, tais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico. Além disso, estas células respondem rapidamente ao estímulo microbiano pela secreção de citocinas e fatores antimicrobicidas, pela expressão de receptores de quimiocinas CCR2, e pela migração para o sítio da infecção em resposta a secreção de proteínas quimioatraentes como MCP-1, MIP-1 α , MCP-2, IL-8 bem como aos fragmentos do sistema complemento C3a e C5a.

Além de todas estas funções alguns leucócitos exercem ainda papel essencial na ligação da imunidade inata com a imunidade adquirida pela apresentação de antígenos para as células T via MHC classe II (HUBER-LANG et al., 2002; TAYLOR, 2003; BEUTLER, 2004; LUSTER et al., 2005; SERBINA, 2008).

Para atuar como células maduras funcionais os macrófagos e neutrófilos passam por diversos estágios de maturação na medula óssea antes de atingir a circulação. O processo pelo qual as células sanguíneas de linhagens distintas são produzidas a partir de células-tronco pluripotentes é denominado hematopoese. Dentro deste dinâmico e contínuo processo de desenvolvimento chamamos de mielopoese a formação dos granulócitos e dos monócitos. Este processo dá-se pelo comprometimento de precursores mielóides seguido pela sua expansão e diferenciação terminal, envolvendo a ação coordenada de citocinas e de fatores de transcrição específicos para cada linhagem celular (SHIVDASANI et al., 1996; SKALNIK, 2002).

O microambiente da medula óssea desempenha importância fundamental na proliferação e diferenciação das células hematopoéticas, bem como no controle da migração das células maduras para o sangue periférico (TAVASSOLI, 1983; FOUCAR, 1995).

As células-tronco hematopoéticas (HSCs) (do inglês: Hematopoietic Stem Cell) têm a habilidade de promover a contínua renovação celular pela proliferação controlada e diferenciação em todas as células da linhagem hematopoética. As HSCs dividem-se para formar células progenitoras comprometidas com a formação de linfócitos – os progenitores linfóides comuns (CLPs) (do inglês: common lymphoid progenitors) e com a formação de células mielóides (CMPs) (do inglês: common myeloid progenitors).

Os CMPs originam os progenitores eritróides-megacariócitos (MEPs – do inglês: megakaryocyte-erythroid progenitors) comprometidos com a formação dos eritrócitos e megacariócitos, além de formarem os progenitores granulócitos-macrófagos (GMPs - do inglês: granulocyte-macrophage progenitors) capazes de gerar os neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (KONDO, 1997; AKASHI et al., 2000).

O desenvolvimento dos mamíferos necessita da progressão regulada das células a partir de um estado de totipotência até a diferenciação terminal em

várias células tecido-específicas. Os mecanismos moleculares que controlam o processo de diferenciação e desenvolvimento de um tipo celular específico envolvem tanto propriedades intrínsecas quanto estímulos externos. Durante a maturação na MO, os neutrófilos e monócitos são expostos a altos níveis de citocinas, sendo que algumas destas, como por exemplo, o fator estimulante de crescimento de granulócitos (G-CSF) e fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) são encontrados em níveis elevados em doenças infecciosas por bactérias (SKALNIK, 2002).

As citocinas hematopoiéticas G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5 e as quimiocinas, IL-8 e MCP-2, controlam a capacidade proliferativa e a taxa de renovação dos leucócitos. O G-CSF e o GM-CSF são citocinas essenciais nos processos de diferenciação e proliferação dos precursores de granulócitos e monócitos na medula óssea, além de permitirem a sobrevivência das células maduras (BERLINER, 1998).

O GM-CSF é uma citocina pleiotrópica produzida por várias células, incluindo macrófagos, mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais em resposta a ativação imune e a citocinas que medeiam a inflamação, exercendo seus efeitos sobre uma variedade de tipos celulares do compartimento hematopoético, principalmente atuando na diferenciação das células da série mielóide. Esta citocina age pela ligação a receptores heterodiméricos de superfície celular (GM-CSFR) compostos de duas subunidades, α (específica) e β (comum, transdutora de sinal), sendo esta última compartilhada pelos receptores IL-3R e IL-5R (COUSINS et al., 1994; WOODCOCK et al., 1997).

O ácido retinóico (ATRA) também promove a diferenciação e proliferação celular. A resposta das células mielóides ao ácido retinóico é mediada por duas famílias de fatores de transcrição, incluindo os receptores de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóicos (RXRs). Quando ocorre a ligação e ativação do RARs e RXRs, estes funcionam como fatores de transcrição que controlam a expressão dos genes alvos pela ligação às sequências específicas na molécula de DNA denominadas elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs). Assim, os RARs e RXRs desempenham um importante papel na regulação da transdução de sinais para a diferenciação das células mielóides.

Três formas de receptores de ácidos retinóicos (RARs) e receptores X retinóicos (RXRs) têm sido identificados: α , β e γ . RAR α e RAR γ são descritos por

serem as formas mais importantes na regulação da granulopoese. Estudos realizados em células da medula óssea derivada de camundongos deficientes do RAR α e do RAR γ , onde as células sofreram um bloqueio da granulopoese, revelaram o papel essencial da sinalização mediada pelo RAR na diferenciação terminal dos granulócitos (WARREL et al., 1991; CHAMBON, 1996; LABRECQUE et al., 1998). A ação sinérgica de GM-CSF e ATRA induz a expressão de mRNA de receptores de ácido retinóico e da molécula CD38 (SHIMIZU e TAKEDA, 2000).

A molécula CD38 é uma ectoenzima multifuncional que converte o NAD⁺ em ADP-ribose cíclico. Esta molécula exerce um importante papel na modulação da sinalização e proliferação celular, apoptose, migração neutrofílica além de outras funções. É expressa de maneira heterogênea durante a diferenciação hematopoética e está presente em uma variedade de células imaturas humanas e murinas com alto potencial de renovação e diferenciação. Os progenitores mielóides murinos expressam altos níveis de CD38, que decrescem no curso da maturação mielóide. Na linhagem linfóide o CD38 é expresso intensamente em linfócitos ativados e plasmócitos (TODISCO et al., 2000). O mesmo parece não ocorrer com os neutrófilos recém diferenciados na medula óssea (PARTIDA-SANCHEZ et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003).

A mielopoese envolve a ação coordenada de citocinas e fatores de transcrição que participam da expansão de precursores e da diferenciação funcional em células mielóides maduras. Esta última fase abrange a mobilização de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias que constituem um importante reservatório de proteínas antimicrobianas tais como, proteases, componentes do *burst* oxidativo, incluindo ainda, uma ampla variedade de receptores de membrana para moléculas de adesão endoteliais, proteínas da matriz extracelular e mediadores solúveis da inflamação (FRIEDMAN, 2002; LOTEM e SACHS, 2002; FARSCOU e BORREGAARD, 2003).

Dentre os marcadores iniciais da diferenciação de PMN estão o Receptor do fator estimulante de crescimento de granulócitos (G-CSFR), CD33 e o CD13 e os componentes dos grânulos primários tais como: mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos (NE), mieloblastina e lisozima. Dentre os marcadores terminais podemos citar a lactoferrina, a gelatinase e o marcador de superfície Ly-6G/Ly-6C (GR1). As células monocíticas em estágios iniciais podem ser

identificadas pela alta expressão do receptor do fator estimulante de crescimento de monócitos (M-CSFR) e Fc γ R (II/III) e pela presença de lisozima. Os marcadores tardios incluem o F4/80, CD14 e a β_2 integrina (CD11b/CD18), sendo que esta última também é expressa em neutrófilos, células B e algumas subpopulações de células T (ANDERSON et al., 1986; FRIEDMAN, 2002; CHRISTENSEN et al., 2001).

Vários processos malignos surgem a partir de células do sistema hematopoético, sendo que alguns destes ocorrem em consequência de um bloqueio na completa diferenciação e maturação dos precursores celulares (leucemias), resultantes de um gene funcionalmente anormal (CORK e PURUGGANAN, 2004).

Os precursores mielóides sofrem mudanças funcionais e morfológicas ao longo do processo de maturação mielocítica, que estão associadas às alterações do tamanho da célula, da forma do núcleo e do desenvolvimento de organelas estágio-específicas. A maturação dos neutrófilos inicia-se a partir dos mieloblastos (MB) e promielócitos (PM), quando os grânulos primários ou azurofílicos peroxidase-positivos tornam-se aparentes. Em seguida ocorre a transformação em mielócitos (MC) no momento em que cessa a divisão celular e surgem os grânulos secundários ou específicos peroxidase-negativos, diferenciam-se em metamielócitos (MM), bastonetes (BC) e finalmente em neutrófilos maduros (PMN) com núcleo segmentado e grânulos terciários ou de gelatinase (BERLINER, 1998; FRIEDMAN, 2002; STROBL et al., 1993).

Muitas das proteínas predominantes nos grânulos azurofílicos são altamente expressas no início da diferenciação mielóide e em seguida são negativamente reguladas quando ultrapassam o estágio de promielócitos. Outras proteínas são expressas somente nos estágios terminais da diferenciação mielocítica, como aquelas presentes nos grânulos peroxidase-negativos, que podem ser constituídos de três metaloproteinases: colagenase (MMP-8), gelatinase (MMP-9) e a leucolisina (MMP-25) (BAITON et al., 1971; KJELDSEN et al., 1992). Portanto é possível caracterizá-las pelo perfil de expressão gênica durante o processo de diferenciação celular (BORREGAARD e COWLAND, 1997; FARSCOU e BORREGAARD, 2003).

A fusão dos grânulos com a membrana plasmática resulta na incorporação das proteínas dos grânulos à superfície celular. A $\beta 2$ -integrina (CD11b/CD18) é um exemplo. É expressa em altos níveis nas vesículas secretórias e na superfície celular, conferindo aos granulócitos circulantes a capacidade de responder a estímulos e ligar-se aos receptores nas células endoteliais ativadas (HUGUES, 1992).

Os mecanismos moleculares que controlam os processos de diferenciação celular hematopoética envolvem importantes reguladores transcricionais que induzem a expressão de genes específicos para uma determinada linhagem. Da mesma forma, o controle da expressão das proteínas dos grânulos dos neutrófilos é mediado pela combinação da expressão de fatores de transcrição em estágios específicos durante a mielopoese (SKALNIK, 2001; FARSCOU e BORREGAARD, 2003)

A **figura 1** representa os fatores produzidos durante os estágios distintos da mielopoese. Dentre estes fatores estão as proteínas dos grânulos, proteínas de superfície celular e os fatores de transcrição responsáveis pela ativação dos diferentes estágios de maturação granulocítica.

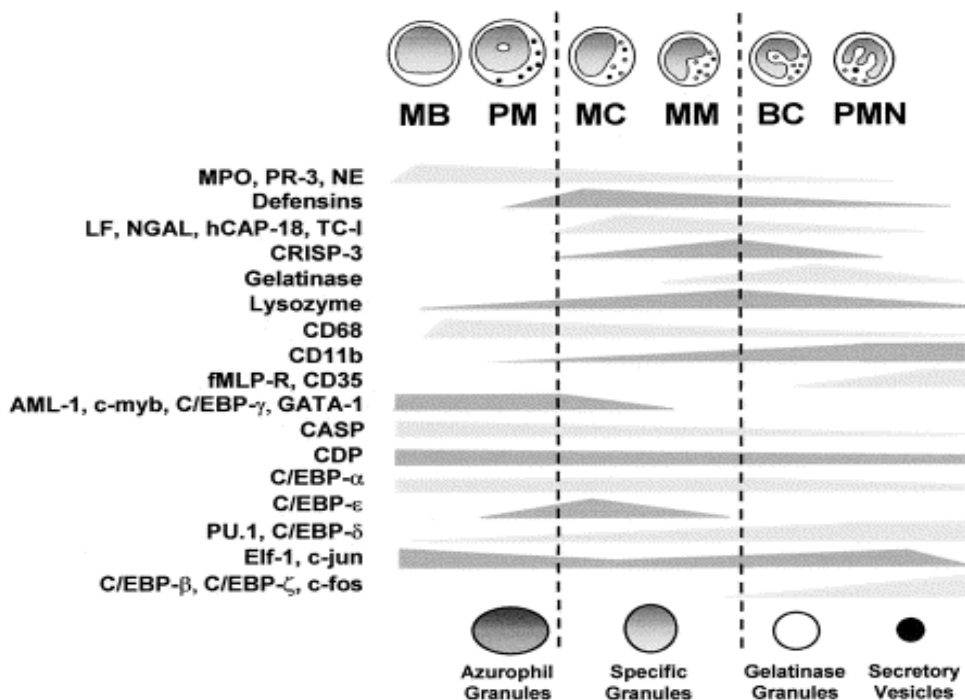


FIGURA 1: Representação da expressão de genes e fatores de transcrição em estágios distintos da mielopoese. Biossíntese dos grânulos e proteínas dos grânulos dos neutrófilos (FONTE: FARSCOU e BORREGAARD, 2003).

Os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação hematopoética podem ser divididos em 2 categorias: fatores geralmente necessários para definir a hematopoiese, incluindo AML1/Runx1 e GATA-2, e aqueles envolvidos mais especificamente na diferenciação de uma única ou de poucas linhagens celulares, tais como PU.1, C/EBPs, GATA-1, GATA-3, Pax5 e E2A.

Estudos recentes vêm demonstrando que diversos fatores de transcrição, como os membros da família C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Protein), PU.1, Gfi1 e AML-1, estão envolvidos na diferenciação de progenitores mielóides (FRIEDMAN, 2002). Dentre estes fatores, o C/EBP α e o C/EBP ϵ têm seus efeitos mais relacionados com a produção de neutrófilos (ANDERSON et al., 1998; ANDERSON et al., 1999).

O gene C/EBP α é expresso em muitos tecidos, incluindo o fígado, sangue e tecido adiposo. É descrito como um gene responsável pela regulação de outros genes críticos para os passos tardios da diferenciação mielocítica, além de ligar-se aos promotores destes genes e aumentar a expressão de um grande número de genes específicos mielóides, incluindo os receptores de citocinas para M-CSF, G-CSF e GM-CSF (LeCABEC et al., 1996; LeCABEC et al., 1997). Camundongos deficientes de C/EBP α apresentam múltiplas anormalidades, dentre elas glicogênese prejudicada, anormalidades na formação de órgãos como o pulmão e o desenvolvimento prejudicado de neutrófilos devido à ausência de sinalização de G-CSF (WANG et al., 1995; ZHANG et al., 1997).

O PU.1 é um fator de transcrição crítico para a diferenciação granulocítica normal. Camundongos deficientes de PU.1 mostram comprometimento na formação de macrófagos maduros, neutrófilos, células dendríticas, osteoclastos, células B e T (ANDERSON et al., 1998).

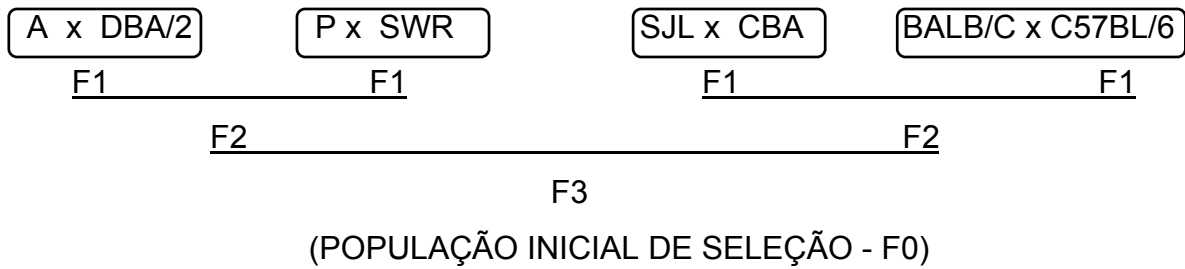
Os RAR α e RAR γ são descritos por serem mais importantes na regulação da diferenciação celular para granulócitos, sendo esta descoberta demonstrada em estudos realizados em células da MO oriundas de camundongos deficientes de RAR α e RAR γ . Estas células sofreram um bloqueio na diferenciação, não ultrapassando a fase de mielócito, mostrando uma absoluta necessidade da sinalização mediada pelo RAR na diferenciação terminal granulocítica (LABRECQUE et al., 1998).

O gene c-myb é necessário para a proliferação e sobrevivência de progenitores mielóides normais e células blásticas leucêmicas. A importância deste gene é demonstrada em estudos que evidenciam que a perda da expressão de c-myb prejudica a hematopoese normal, reduzindo a formação de colônias mielóides e eritróides (MUCENSKI et al., 1991; GEWIRTZ e CALABRETTA, 1988). O c-myb modula também os níveis de expressão de outros genes expressos no início da diferenciação mielocítica. O gene Bcl-2, com função regulatória na apoptose, é um dos alvos do gene c-myb sobre as células hematopoiéticas (MELOTTI et al., 1994; RATAJCZAK et al., 1998; FRAMPTON, 1996)

O desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda eficaz depende da diferenciação de células mielocíticas nos tecidos hematopoiéticos em células diferenciadas. Esta diferenciação está diretamente relacionada com os mecanismos de mobilização de proteínas granulares e da ação coordenada de fatores de transcrição, que, em conjunto, levam à maturação terminal de células inflamatórias efectoras as quais compõem a população armazenada e circulante. Portanto, o tecido hematopoiético é considerado um órgão central da imunidade inata e cuja atividade está intrinsecamente relacionada à diferente capacidade de produzir resposta inflamatória.

Linhagens de camundongos selecionadas geneticamente para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda (IBAÑEZ et al., 1992) constituem um modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos na mielopoese, uma vez que os neutrófilos constituem a população predominante nos processos inflamatórios agudos desenvolvidos em intensidades diferentes por estes animais.

Estas linhagens de alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda foram obtidas a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogênea (F0), resultante de acasalamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), híbridos F1 e segregantes F2, conforme esquema a seguir.



O processo de seleção foi baseado nas características fenotípicas da população F0. Foram escolhidos os animais que apresentavam alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR) segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel, agente flogístico quimicamente inerte e não imunogênico. Os acasalamentos foram repetidos em gerações consecutivas até ser atingida a máxima separação fenotípica entre as duas linhagens (**Figura 2**), onde se observou a conservação dos fenótipos extremos, indicando que os alelos dos genes relacionados ao controle da AIR fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, entretanto, um fundo genético heterogêneo (STIFFEL et al., 1990; IBAÑEZ et al., 1992, RIBEIRO FILHO, O.G,1994).

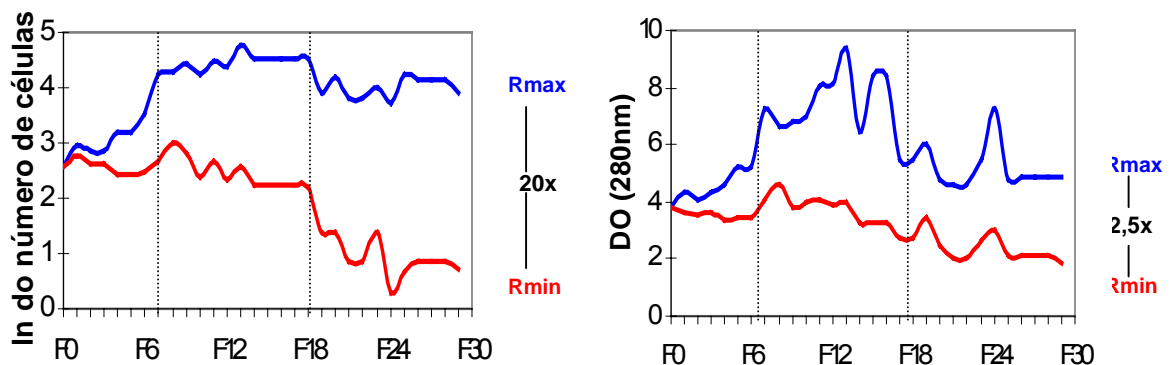


FIGURA 2: Divergência da celularidade e da concentração protéica, no processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin, até a 30ª geração (FONTE: modificado de BIOZZI et al., 1998, com permissão).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens AIR, indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam

independentemente e cujos alelos de efeito de máxima e mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. Por métodos de genética quantitativa foi estimada a participação de 9 a 12 *loci* gênicos independentes na regulação da AIR (IBAÑEZ et al., 1992, BIOZZI et al., 1998).

Atualmente, na 49ª geração, a diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel é de aproximadamente 25 vezes a favor da linhagem AIRmax, sendo os neutrófilos as células predominantes no exsudato. Esta diferença é um fenômeno geral que afeta todos os tecidos vascularizados em resposta a vários agentes flogísticos, tais como carragenina, zimosan e bactérias vivas ou inativas (IBAÑEZ et al., 1992, ARAÚJO et al., 1998).

Este maior número de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax é decorrente de três fatores convergentes: maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltrantes após tratamento com Biogel; maior resistência à apoptose das células do exsudato e maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros (RIBEIRO et al., 2003).

Este último fator compõe o assunto central do nosso estudo, uma vez que contribui decisivamente para a determinação dos fenótipos opostos dos animais AIRmax e AIRmin, com conseqüente impacto na modulação da resistência e susceptibilidade a infecções e neoplasias (ARAÚJO et al., 1998; RIBEIRO et al., 2005; BIOZZI et al., 1998).

A resposta imune específica dos camundongos AIRmax e AIRmin parece não ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos contra antígenos naturais complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente, as reações de hipersensibilidade tardia a eritrócitos ou *Salmonella Typhimurium* foram idênticas nas duas linhagens. Por outro lado, camundongos AIRmax são significativamente mais resistentes a infecções por patógenos intracelulares do que os AIRmin. Os AIRmax diferenciam-se dos AIRmin na ordem de 1000, 100 e 50 vezes as DLs50 para *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, respectivamente. Esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada com a sua habilidade em controlar o crescimento

bacteriano no baço, à resposta inflamatória local e à produção de citocinas (ARAÚJO et al., 1998).

Neste modelo, foram constatadas diferenças significativas em estudos relacionados aos mecanismos inflamatórios e imunes que interferem no desenvolvimento de doenças auto-imunes sendo os AIRmax mais susceptíveis. (VIGAR et al., 2000).

Estes animais foram também analisados quanto a sua capacidade em desenvolver tumores quimicamente induzidos ou transplantados. Um protocolo de carcinogênese química em dois estágios com 7,12 – dimetilbenzatraceno (DMBA), como agente iniciador e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) como agente promotor, foi utilizado no sentido de avaliar o comprometimento epidérmico. Camundongos AIRmax apresentaram maior resistência ao desenvolvimento de tumores cutâneos do que os AIRmin, tanto no número de papilomas (multiplicidade) como na porcentagem de animais acometidos (incidência) (BIOZZI et al., 1998).

A carcinogênese química pulmonar provocada por uretana também discriminou estas duas linhagens. O tratamento com uretana provocou, nos animais AIRmin, múltiplos focos (4 a 16 por camundongo) a partir do 40º dia após o tratamento, caracterizados, histopatologicamente como adenocarcinomas. Por outro lado, os camundongos da linhagem AIRmax mostraram-se altamente resistentes com incidência de 7% (1 em 15 camundongos tratados) aos 100 dias de tratamento e com focos pequenos. Uma associação inversa entre os fenótipos de susceptibilidade a tumorigênese pulmonar e de intensidade da resposta inflamatória aguda foi identificada por meio de análise de co-segregação dos dois caracteres, em população de segregantes F2 entre AIRmax e AIRmin, demonstrando a participação de genes que regulam a intensidade da resposta inflamatória aguda na tumorigênese pulmonar (MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005).

Em vista da grande diferença fenotípica entre as linhagens no que concerne a capacidade inflamatória aguda com impacto na resistência e susceptibilidade a infecções e desenvolvimento de tumores, estudamos comparativamente nestes animais a mielopoese por meio da caracterização celular nos diferentes estágios de maturação e da expressão de genes

diretamente relacionados. Realizamos também uma análise proteômica global no sentido de identificar as proteínas produzidas e envolvidas no processo de diferenciação celular decorrente da estimulação *in vitro* com fatores hematopoiéticos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é o de estudar, comparativamente nas linhagens AIRmax e AIRmin, a mielopoese por meio da análise:

-da diferenciação *in vitro* de células mielóides por meio da ação de fatores hematopoiéticos do tipo: GM-CSF associado ou não ao ácido retinóico;

-da expressão de genes que atuam no processo de diferenciação mielocítica, por meio de experimentos de quantificação de RNAm em reação de PCR em tempo real (*Real-Time* PCR);

-da caracterização do perfil global de proteínas durante o processo hematopoético *in vitro* das células da MO, por meio da identificação das proteínas em gel em duas dimensões.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados animais AIRmax e AIRmin machos da 47^a geração de seleção genética, produzidos e mantidos no biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sob as condições padrões de criação. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.2 Cultura em meio líquido das células da Medula Óssea

Em condições estéreis, as células da medula óssea foram obtidas pela perfusão dos fêmures com meio RPMI 1640 suplementado com 2mM de Glutamina, 1mM de Piruvato, Gentamicina (20 µg/mL), 50 µM de β-Mercaptoetanol e 10% de Soro Fetal Bovino inativado a 56 °C. Após homogeneização, as suspensões foram filtradas em membrana de nylon e, em seguida, foram submetidas à lise das hemácias em tampão de lise (4,15 g de Cloreto de amônia, 0,84 g de Bicarbonato de Sódio e 1 mL EDTA 0,5M pH 8,0 em 500 mL de H₂O destilada) e, após centrifugação, foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. As células foram cultivadas na concentração de 5 x 10⁵ células/mL em placas de 24 poços e estimuladas com 10 ou 50 ng/mL de GM-CSF recombinante (Prepotec, Rocky Hill, NJ), isoladamente ou em combinação com o Ácido Retinóico (All-Trans retinoic acid - ATRA, Sigma) em doses que variaram entre 1x10⁻⁹ a 1x10⁻⁵ M. Combinações com G-CSF e SCF (Prepotec, Rocky Hill, NJ) recombinantes e sobrenadante de cultura de células NIH-3T3 contendo GM-CSF (OHL et al., 2004) também foram utilizadas.

3.3 Avaliação da proliferação celular

Após diferentes tempos de incubação a 37°C e 5% CO₂, as células foram descoladas com o uso de Tripsina 0,05% e EDTA 0,02%, recolhidas e diluídas em Azul de Trypan a 0,2 % para contagem em câmara hemocitométrica de Malassez. Alíquotas das suspensões foram utilizadas na preparação de lâminas para a determinação das subpopulações celulares presentes nas culturas. Para tanto, suspensões na concentração de 5x10⁴/mL foram submetidas a citocentrifugação (80 g) por 5 minutos e coradas com Giemsa (Merck). Foram analisadas no mínimo 200 células e determinada a porcentagem de cada população celular.

3.4 Citometria de fluxo

Células viáveis da cultura líquida da medula óssea foram utilizadas para análise por citometria de fluxo. Alíquotas de 100 µL das suspensões (10⁷ células/mL) foram incubadas com anticorpo bloqueador de porção Fc CD16/CD32 (FcγIII/II) por 10 minutos a 4 °C para, em seguida, serem submetidas às marcações com anticorpos monoclonais específicos dirigidos contra: granulócitos-Ly-6G/Ly-6C (GR-1, clone: RB6), cadeia α de Mac-1 CD11b (clone: Mi/70), CD38 (clone 90), marcados com Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), dependendo da associação desejada. Como Isótipos controles foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1). Todos os anticorpos foram obtidos da PharMingen. O registro de 10000 células foi adotado, utilizando FACScalibur e o programa Cellquest (Becton-Dickinson) para a análise.

3.5 Extração de RNA

As células da medula óssea, após tempos variados de cultura, foram lavadas duas vezes com 1mL de PBS estéril gelado e ressuspendidas em 0,5 mL de solução de Trizol (Invitrogen). Após homogeneização com seringa de 1mL, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (MERCK) para cada 1 mL de Trizol e, em seguida, agitadas no vórtex para ocorrer a inversão de fases. As amostras foram centrifugadas a 12500 g por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes (incolor, contendo RNA) transferidos para outros tubos eppendorf® para o procedimento de

precipitação com 0,5 mL de álcool isopropílico (MERCK). A solução foi agitada no vórtex por 15 segundos e centrifugada a 12500 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75% gelado e centrifugado a 8000 g por 5 minutos a 4 °C. Após a centrifugação as amostras secaram à temperatura ambiente por 10 minutos. Após a secagem, o RNA foi dissolvido em 50 µL de água livre de RNase. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280nm e a integridade e qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em TBE (Tampão Brometo de Etídio).

3.6 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 10 µL contendo 1 µg do RNA foram adicionados a 1µL de Oligo(dT) (50 µM), 2 µL de água livre de RNase e 1 µL de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período, a mistura permaneceu no gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4µL de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂), 1 µL de DTT (0,1M) e 1µL da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase-Invitrogen (200 U/mL). As amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e as reações foram inativadas a 70 °C por 15 minutos. As amostras foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.7 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real

Avaliamos a quantidade de RNA mensageiro dos genes expressos nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin após cultura de 3 a 7 dias, na presença de 50 ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a 10⁻⁷M. A cada amostra de cDNA foram adicionadas as seqüências de primers (5 µM); 6,25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água para ajustar o volume final de reação em 12,5 µL por tubo. As reações foram

incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research), e submetidas a uma fase inicial de incubação a 50 °C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (“hot start”) 95 °C por 5 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 50 ciclos constituídos de etapas sucessivas de denaturação (95 °C por 20 segundos) e de anelamento (60 °C durante 35 segundos). A aquisição da fluorescência incorporada ao material dupla-fita, amplificado a cada ciclo, foi efetuada na etapa de extensão.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase “Melt” onde a temperatura variou de 55 °C a 95 °C. A fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou denaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação.

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03”, conforme indicado.

3.8 Cálculo da expressão relativa

Esse sistema detecta o aumento da quantidade de fitas de DNA marcado com SYBR Green, molécula fluorescente. À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico, é detectada a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora. A cada amostra, é atribuído um valor de cT (Cycle Threshold) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo.

A expressão relativa de RNAm dos genes alvos é calculada pelo método comparativo de cT. A quantidade de gene alvo foi normalizada pelo gene controle endógeno Ciclofilina para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser aquele cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI et al., 2001).

As diferenças nos valores de cT (ΔcT) foram calculadas para cada amostra de RNAm pela média dos cT das duplicatas:

$$\Delta cT = cT_{(\text{gene alvo})} - cT_{(\text{gene endógeno})}$$

A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o ΔcT das amostras em diferentes condições experimentais e o ΔcT do grupo controle (calibrador):

$$\Delta\Delta cT = \Delta cT_{(\text{teste})} - \Delta cT_{(\text{calibrador})}; \text{ a expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta cT}$$

Os resultados foram expressos como o $\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta cT})$. Como calibrador utilizamos o valor da média do ΔcT dos animais AIRmax estimulados por 3 dias com GM-CSF+ATRA, pois estes apresentaram o maior valor de ΔcT , indicando menor expressão gênica.

O método $2^{-\Delta\Delta cT}$ requer que as eficiências dos primers utilizados sejam equivalentes e próximas de 100%. As seqüências dos primers utilizados nos experimentos de expressão gênica estão relacionadas na tabela 1 em Resultados.

3.9 Quantificação do conteúdo protéico total das células da medula óssea

As células da medula óssea foram submetidas ao processo de extração protéica que consiste na lise celular com tampão contendo 8M de uréia, 4% de CHAPS, 40 mM de Tris base e 40mL de H₂O destilada) que ao ser adicionado aos poços de cultura obtêm-se o lisado celular. Este lisado é submetido à centrifugação a 12500 g por 10 minutos e os sobrenadantes obtidos e congelados à -80°C. Foi determinada a concentração protéica pela técnica de BCA (Ac. Bincicônico), utilizando placa de 96 poços. Alíquotas de 25 mL de concentrações decrescente de BSA (Albumina Sérica Bovina) foram adicionadas na placa para determinar a curva padrão. As amostras foram então diluídas seriadamente na razão 2. Após adição dos reagentes a placa foi transferida para a estufa à 37°C e incubada por 30 minutos. Decorrido este tempo as densidades óticas das amostras foram determinadas a 520 nm (Labsystem). Baseado na curva padrão, podemos determinar a concentração protéica das amostras.

3.10 Análise de proteínas em gel SDS-PAGE de duas dimensões (2D)

As amostras de proteínas obtidas das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin após 3 a 7 dias de cultura, na presença de 50 ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a $10^{-7}M$, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad) e aplicados 40 μg a 100 μg , dependendo da quantidade de proteínas obtidas para cada condição de cultura, ao terminal catódico de membranas de gel de gradiente imobilizado de pH (immobilized pH gradient gel IPG, Pharmacia Biotech) na faixa de pH 3 a 10. As fitas foram re-hidratadas por 18 horas à temperatura ambiente, utilizando tampão de re-hidratação (8 M de uréia, 1M de DTT, 2% de CHAPS e 0,5% de tampão IPG) e a eletro-focalização foi realizada por 18-20 hs a 32000 Vh, utilizando uma unidade IPGphor (Amersham bioscience). Em seguida, os géis foram equilibrados por 10 minutos em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 100 mg DTT (Dithiothreitol) e por mais 10 minutos em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 250mg de iodoacetamida. Para a eletroforese na segunda dimensão, as fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em sistema Hoefer SE600 (Amersham Pharmacia) o qual foi submetido a uma corrente elétrica de 600V 30 mA por 1h e em seguida 600v 80mA por aproximadamente 3hs.

3.11 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata

Os géis foram fixados com 50% de metanol / 12% de ácido acético e formaldeído 37% overnight. Após a fixação, os géis foram lavados com uma solução de 30% de etanol durante 1 minuto no forno de microondas e mantidos sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os géis foram sensibilizados por 1 minuto no forno de microondas com uma solução de 0,02%

de tiosulfato de sódio e agitados à temperatura ambiente por 2 minutos. Após a sensibilização, os géis foram lavados 2x com água destilada e incubados em 0,2% de nitrato de prata por 30 segundos em forno de microondas e 5 minutos no agitador à temperatura ambiente. Foi realizada mais uma lavagem com água antes de acrescentar uma solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio. Por fim, a reação foi interrompida com 12% de ácido acético e 50% de metanol. As imagens dos géis foram obtidas no ImageScanner III (GE Healthcare) e estas foram analisadas no programa de análise ImageMaster 6.0®.

3.12 Análise Estatística

As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA, considerando níveis significativos aqueles inferiores a 0,05, bicaudal.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Cinética e Dose-Resposta da proliferação in vitro das células da medula óssea cultivadas sob estímulo de GM-CSF e Ácido Retinóico

Para pesquisar o nível de diferenciação mielocítica, comparativamente em camundongos AIRmax e AIRmin, realizamos ensaios in vitro de proliferação e de diferenciação das células da medula óssea obtidas dos camundongos normais submetidas à estimulação com GM-CSF isolado ou em combinação com ácido retinóico (ATRA)

As células foram cultivadas na concentração de 5×10^5 células/ml na presença de diferentes concentrações de GM-CSF (10ng e 50ng) e de ATRA (10^{-7} e 10^{-5} M). Após 3, 5 e 7 dias de cultura em fase líquida, as suspensões foram avaliadas quanto ao número total de células e os resultados expressos como a média do número de células por mL (**Figura 3**).

Verificamos neste experimento que as células cultivadas somente com meio de cultura apresentaram baixo nível de proliferação em todos os períodos de maneira equivalente em AIRmax e AIRmin. Por outro lado, quando as células foram estimuladas com 10ng de GM-CSF, sozinho ou combinado ao ATRA, verificamos um pequeno aumento na proliferação semelhante nas duas linhagens. Com o estímulo de 50ng de GM-CSF observamos um aumento significativamente maior em relação às células não estimuladas, sendo a associação com as doses de ATRA as condições que induziram melhor proliferação celular nos diferentes tempos de cultura para as duas linhagens.

Nos dados de proliferação de 3 dias de cultura observamos um aumento significativo no número de células após estímulo com a dose de 50ng de GM-CSF sozinho ou em combinação com ATRA em relação às células não estimuladas. Além disso, ao compararmos o número de células na resposta proliferativa a dose de 10ng de GM-CSF com ou sem ATRA com a resposta observada com 50ng de GM-CSF com ou sem ATRA 10^{-5} M ou 10^{-7} M verificamos uma diferença significativa, diferença esta observada apenas nos animais AIRmax. Esta maior resposta das células da medula óssea dos animais AIRmax a 50ng de GM-CSF+ATRA 10^{-5} M ou 10^{-7} M resultou em uma diferença interlinhagens altamente significativa.

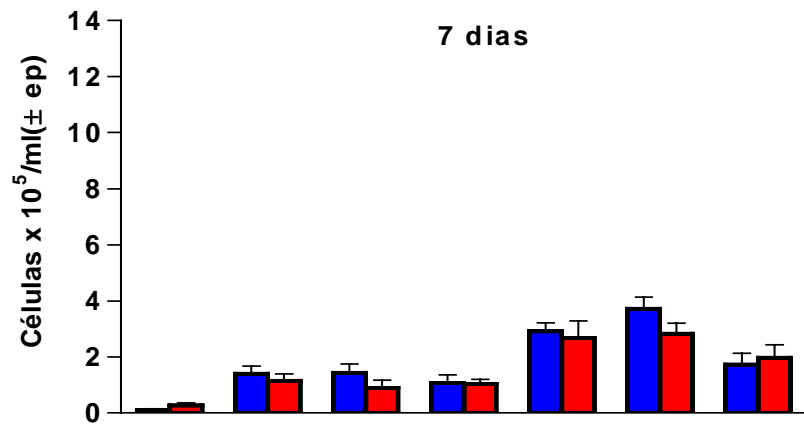
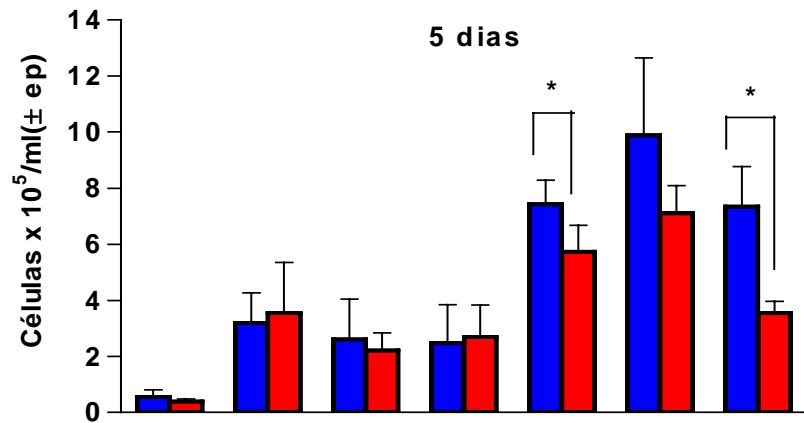
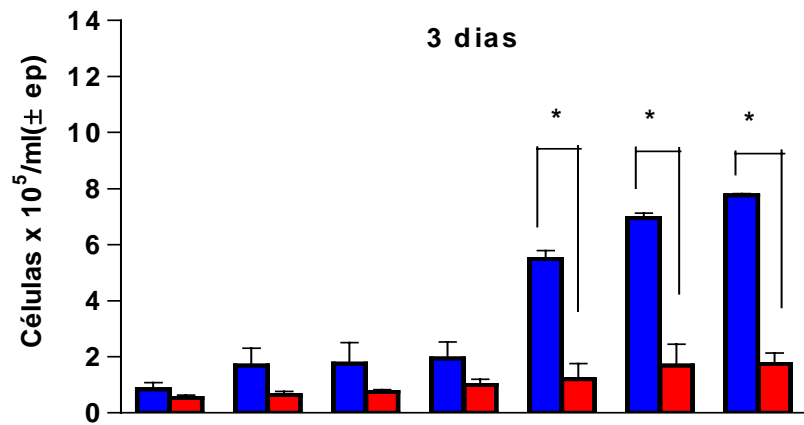
Aos 5 dias de cultura constatamos um aumento de proliferação tanto nos animais AIRmax quanto nos AIRmin para todas as concentrações utilizadas, sendo esta resposta aumentada sempre mais evidente quando utilizamos a dose de 50ng de GM-CSF. Neste tempo de cultura observamos um aumento no número de células dos animais AIRmin com relação ao período de 3 dias de cultura em resposta a 50ng de GM-CSF com ou sem ATRA. No entanto, assim como aos 3 dias de cultura, observamos diferença significativa interlinhagens para o estímulo com 50ng de GM-CSF isolado ou na presença de ATRA 10^{-7} M. Nesta última condição a resposta proliferativa foi pelo menos 2 vezes superior a favor dos animais AIRmax em relação aos animais AIRmin com valores de $7,34 \pm 1,43 \times 10^5$ /ml e $3,54 \pm 0,42 \times 10^5$ /ml, respectivamente.

Aos 7 dias de cultura ocorreu uma diminuição no número total de células para todas as doses e estímulos e não observamos mais as diferenças interlinhagens encontradas nos tempos de 3 e 5 dias de cultura. Ainda assim, a dose de 50ng de GM-CSF associada ou não ao ATRA 10^{-5} M ou 10^{-7} M induziu maiores níveis de proliferação aos 7 dias para ambas as linhagens.

Nestes experimentos pudemos verificar que a concentração de 10ng de GM-CSF associada ou não a qualquer concentração de ATRA induziu baixa proliferação e revelou pequena diferença interlinhagens. O estímulo de 50ng de GM-CSF sozinho ou não, foi capaz de induzir uma alta proliferação, principalmente nas células da medula óssea dos camundongos AIRmax, onde observamos uma diferença interlinhagens significativa nos dias 3 e 5 de cultura para a associação de 50ng de GM-CSF com ATRA 10^{-7} M. Assim, para os experimentos subsequentes, utilizamos a dose de 50ng de GM-CSF associada ao ATRA a 10^{-7} M como condições favoráveis para avaliar, comparativamente em AIRmax e AIRmin, o fenótipo celular por citometria de fluxo e morfologia, pela coloração Giemsa, nas várias etapas de diferenciação. Além disso, analisamos a expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação celular e de proteínas produzidas pelas células dos animais AIRmax e AIRmin no processo de diferenciação *in vitro*. Estas abordagens foram consideradas nos três tempos de cultura, objetivando uma interpretação mais geral do processo de diferenciação operante nas células da medula óssea destes animais.

Foram realizados experimentos com outras doses de GM-CSF combinadas ao ATRA, onde verificamos uma baixa proliferação em todos os casos. Além

disso, ensaios variando somente a dose de ATRA (10^{-5}M a 10^{-9}M) bem como experimentos com pulsos diários de ATRA ou de GM-CSF demonstraram que as condições ideais foram aquelas já citadas, ou seja: 50ng de GM-CSF associados ao ATRA a 10^{-7}M .



GM-CSF 10ng	-	+	+	+	-	-	-
GM-CSF 50ng	-	-	-	-	+	+	+
ATRA 10 ⁻⁵ M	-	-	+	-	-	+	-
ATRA 10 ⁻⁷ M	-	-	-	+	-	-	+

FIGURA 3: Resposta proliferativa das células da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) a doses variadas de GM-CSF e ATRA, após 3, 5 e 7 dias de cultura. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais por grupo. Resultados de 2 experimentos independentes. * Indica diferença entre AIRmax e AIRmin p <0,05

4.1.1 Caracterização das populações celulares da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin durante o processo de mielopoese *in vitro*

Para a caracterização das populações celulares oriundas das culturas das células da medula óssea de AIRmax e AIRmin após estímulo *in vitro* com 50ng de GM-CSF associados ou não ao ATRA a 10^{-7} M, realizamos ensaios de citometria de fluxo com comparação por histologia durante o processo de mielopoese.

Inicialmente submetemos as células da medula óssea às condições de cultura estabelecidas e em seguida foram cuidadosamente recolhidas e marcadas com anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície Ly-6G (GR1)-FITC, CD11b-PE, CD38-PE, bem como com os isótipos controles. Foi feita a aquisição em citômetro de fluxo, considerando 10000 eventos e os dados foram analisados com o auxílio do programa CellQuest-Pro. Foram consideradas para análise as células viáveis por exclusão em marcação com Iodeto de Propídio (**Material e Métodos**).

As associações de anticorpos CD11b/GR1 e de CD38/GR1 possibilitam a identificação de populações celulares macrofágicas/neutrófilas e de fases da diferenciação celular, respectivamente (LAGASSE e WEISSMAN, 1996; KIRK et al., 1995, TERSTAPEN, 1991; RIBEIRO et al., 2003).

Conforme a classificação de células mielóides da medula óssea de camundongos realizada por Lagasse e Weissman em 1996 e por Ueda e colaboradores em 2005, podemos, no nosso sistema *in vitro*, sugerir os fenótipos celulares obtidos após estímulo com GM-CSF e ATRA. Assim classificamos as seguintes populações: CD11b⁻/GR1⁻ que consistem de células indiferenciadas que não apresentaram estas moléculas na superfície; CD11b^{low}/GR1⁻ como precursores mielocíticos e também células monocíticas; CD11b^{high}/GR1^{neg-low} com sendo células nos estágios iniciais da diferenciação neutrófila (promielócito e mielócito) e monócitos e macrófagos; e por último a população CD11b⁺/GR1⁺ que corresponderia às células granulocíticas em estágios mais avançados da diferenciação (metamielócito e células com núcleo em anel) e neutrófilos segmentados (LAGASSE e WEISSMAN, 1996; UEDA et al., 2005). Na **figura 4A** estão representados citogramas de células de AIRmax e AIRmin destacando estas populações.

A análise proliferativa total revelou que após 3 e 5 dias de cultura as células dos animais AIRmax apresentaram proliferação celular significativamente maior do que aquelas oriundas dos AIRmin em resposta ao GM-CSF e GM-CSF+ATRA. O mesmo perfil não foi observado aos 7 dias de cultura (**Figura 4B**).

Considerando estes dois períodos de cultura, as populações de células mielóides apresentaram diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin. Estas diferenças foram observadas nas populações CD11b^{low}/GR1⁻ (**pop 2**) e CD11b^{high}/GR1^{neg-low} (**pop 3**) nas células estimuladas com GM-CSF e GM-CSF+ATRA aos 3 e 5 dias e na população CD11b⁺/GR1⁺ (**pop 4**) nas células estimuladas apenas com GM-CSF+ATRA aos 3 dias.

Ao compararmos o número total de células em resposta ao estímulo apenas com GM-CSF em relação à combinação de GM-CSF+ATRA observamos valores aproximados tanto para a proliferação total quanto para as populações celulares reveladas pela marcação com CD11b e GR1 nos três períodos de cultura avaliados.

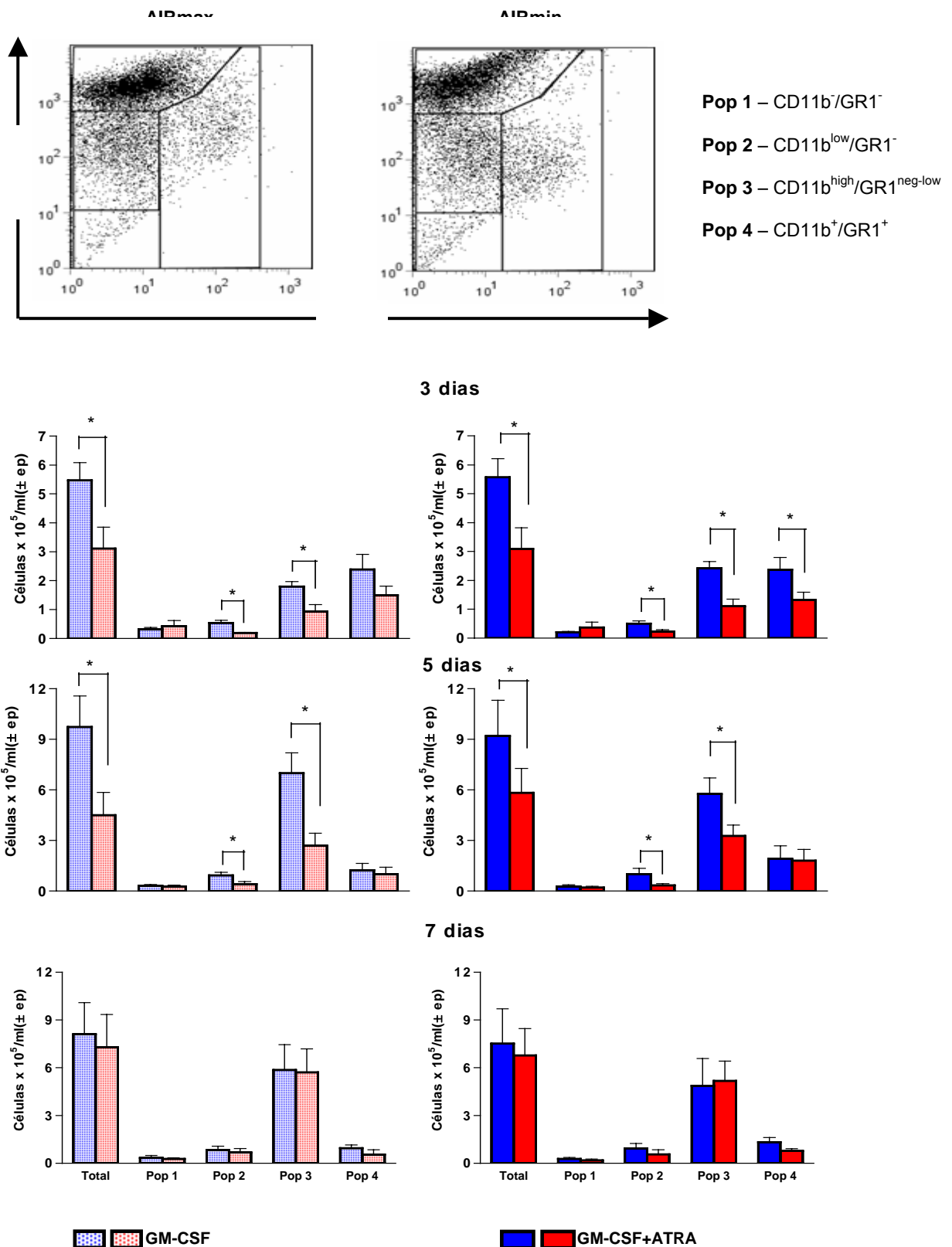


FIGURA 4: Caracterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 3, 5 e 7 dias de cultura, estimuladas com 50ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a $10^{-7}M$. **A**-Citogramas representativos das populações celulares evidenciadas pela marcação CD11b/GR1. **B** -Representações dos valores absolutos da proliferação total e das populações com fenótipo $CD11b^-/GR1^-$ (**Pop 1**), $CD11b^{low}/GR1^-$ (**Pop 2**), $CD11b^{high}/GR1^{neg-low}$ (**Pop 3**) e $CD11b^+/GR1^+$ (**Pop 4**). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão, N=5. * Diferença entre AIRmax e AIRmin $p < 0,05$.

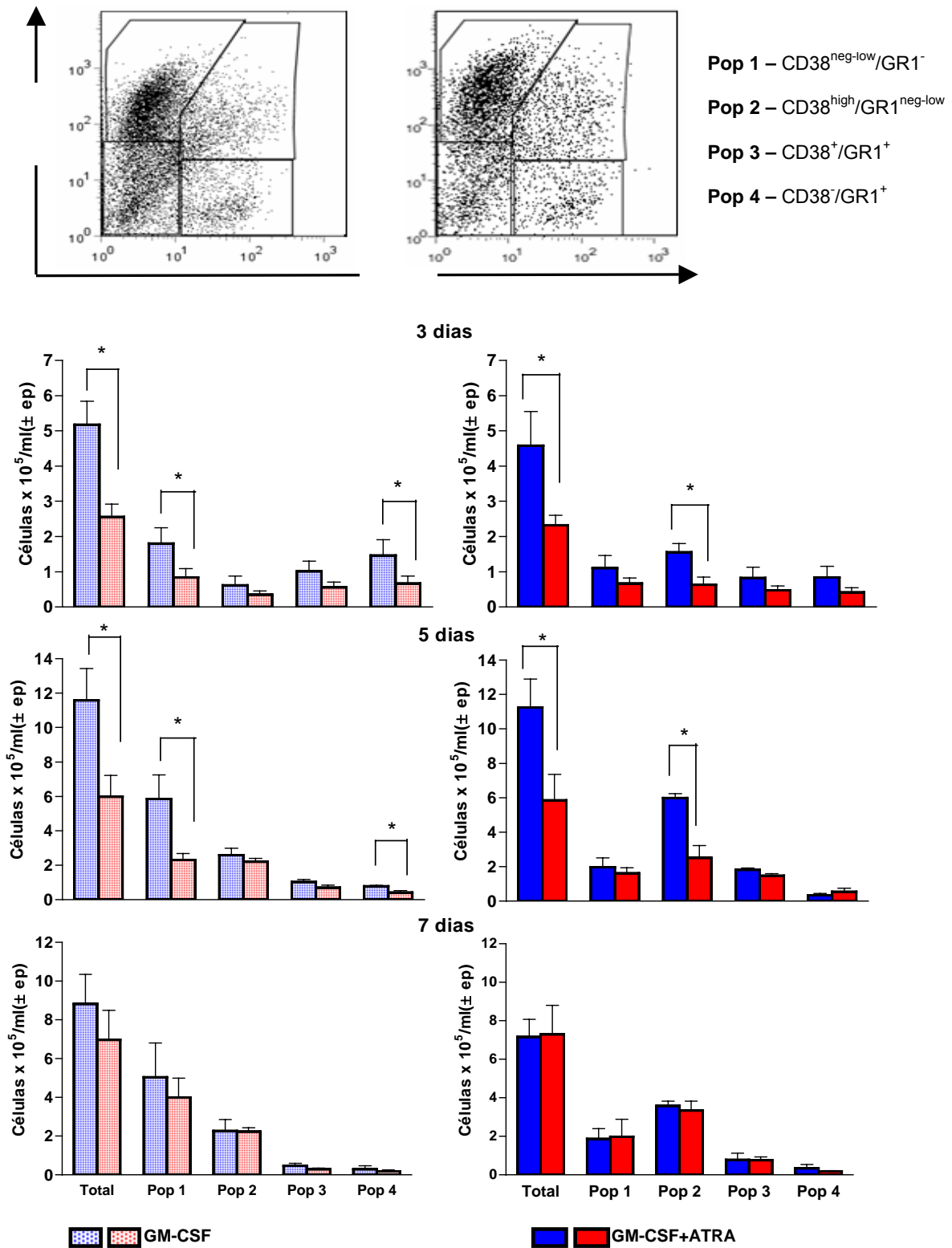


FIGURA 5: Caracterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■), após 3, 5 e 7 dias de cultura, estimuladas com 50ng de GM-CSF associado ou não ao ATRA a 10⁻⁷M. **A** - Citogramas representativos das populações celulares evidenciadas pela marcação CD38/GR1. **B** - Representações dos valores absolutos da proliferação total e das populações com fenótipo CD38^{neg-low}/GR1⁻ (**Pop 1**), CD38^{high}/GR1^{neg-low} (**Pop 2**), CD38⁺/GR1⁺ (**Pop 3**) e CD38⁻/GR1⁺ (**Pop 4**). Os valores estão expressos como média ± erro padrão, N=5. * Diferença entre AIRmax e AIRmin $p < 0.05$.

Com a associação dos anticorpos específicos para as moléculas CD38 e Ly-6G/Ly-6C (GR1) podemos avaliar o processo de diferenciação em granulócitos, por meio da diminuição e aumento progressivos da expressão de CD38 e de GR1, respectivamente. Desta forma, quatro populações definidas podem ser visualizadas conforme representação na **figura 5A**, cujos fenótipos $CD38^{neg-low}/GR1^{-}$, $CD38^{high}/GR1^{neg-low}$, $CD38^{+}/GR1^{+}$ e $CD38^{-}/GR1^{+}$, correspondendo às populações **1**, **2**, **3** e **4**, respectivamente.

Assim podemos interpretar um sentido de diferenciação celular nos citogramas, que se inicia na população abaixo à esquerda (**pop 1**), em sentido horário do gráfico, indo até a população abaixo à direita (**pop 4**). Nesta última considera-se as células em estágios finais de diferenciação (neutrófilos) (RIBEIRO et al., 2003).

Os resultados apresentados na **figura 5B** representam os valores absolutos calculados a partir das porcentagens verificadas nos citogramas e plotados individualmente para cada fenótipo e em cada tempo de cultura. Observamos uma proliferação das células da medula óssea dos animais AIRmax significativamente maior do que nos animais AIRmin após 3 e 5 dias de cultura em resposta ao GM-CSF e GM-CSF+ATRA. O mesmo perfil não foi observado aos 7 dias de cultura.

Verificamos um número significativamente maior de células com fenótipo $CD38^{neg-low}/GR1^{-}$ (**pop 1**) e $CD38^{-}/GR1^{+}$ (**pop 4**) nos animais AIRmax do que nos AIRmin, aos 3 e 5 dias de cultura, para o estímulo apenas com GM-CSF. A adição do ATRA à cultura favoreceu o aumento de uma população celular um pouco mais diferenciada nos animais AIRmax, apresentando assim uma diferença interlinhagens significativa para o fenótipo $CD38^{high}/GR1^{neg-low}$ (**pop 2**) também aos 3 e 5 dias de cultura no estímulo com GM-CSF associado ao ATRA.

Todavia, não observamos diferença significativa no fenótipo celular que corresponderia às células em estágios mais avançados de diferenciação, para ambos os estímulos, sendo observado apenas uma tendência das células dos animais AIRmax apresentarem um maior número do que as células dos animais AIRmin.

Após 7 dias de cultura não observamos diferenças significativas interlinhagens quanto à proliferação total ou para os fenótipos celulares definidos pelas marcação CD38 e GR1.

A adição de ATRA às culturas favoreceu o aumento da expressão de CD38 nas células durante a diferenciação, fato este que pode ser demonstrado nos tempos de 3 e 5 dias de cultura. Verificamos uma mudança de perfil celular CD38^{neg-low}/GR1⁻ nas células estimuladas apenas com GM-CSF para um predomínio de células CD38^{high}/GR1^{neg-low} naquelas estimuladas com GM-CSF+ATRA..Este aumento de expressão ocorreu nas culturas das linhagens, AIRmax e AIRmin (**Figura 6**).

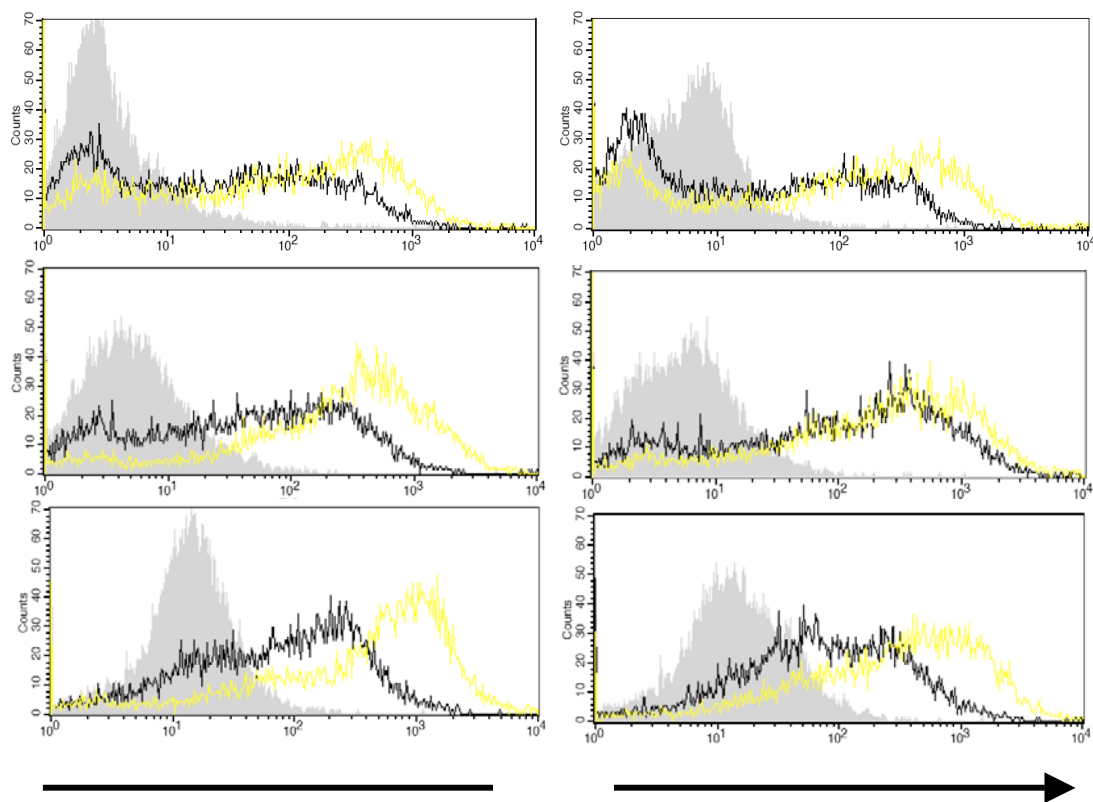


FIGURA 6: Histograma da expressão de **CD38** nas células da medula óssea, cultivadas por 3, 5 e 7 dias, dos camundongos AIRmax e AIRmin. Isotipo padrão (—), GM-CSF (—) e GM+ATRA (—).

4.1.2 Análise morfológica das células da MO após tempos variados do estímulo com GM-CSF associado ou não ao ATRA

Para confirmar os dados de citometria de fluxo, foram realizadas preparações histológicas das culturas após tempos variados. Com o auxílio de citocentrífuga e coloração por Giemsa, determinamos a porcentagem de células em estágios distintos da diferenciação mielocítica. Para isso cerca de 200 células foram analisadas quanto à morfologia nuclear e a coloração dos grânulos citoplasmáticos. Consideramos neste trabalho os blastos e mieloblastos ou monoblastos, denominados de forma geral como mieloblastos, como células precursoras hematopoéticas e os estágios seguintes de maturação neutrofílica (promielócitos, mielócitos, metamielócitos, núcleo em anel e neutrófilo segmentado) como granulócitos, pois estas são células comprometidas com a formação de neutrófilos maduros. Diferentemente dos neutrófilos, as células jovens comprometidas com a formação de macrófagos e monócitos são difíceis de serem identificadas já que não apresentam grânulos específicos nem núcleos lobulados (FOUCAR, 1995). Assim sendo classificamos este tipo celular como macrófagos e monócitos, não considerando os diferentes estágios de diferenciação.

As várias populações celulares foram visualizadas e registradas na **figura 7A**, onde podemos conferir cada fase de maturação. e a classificação das células precursoras, dos granulócitos e dos monócitos/macrófagos. A **figura 7B** mostra o aspecto geral das culturas estimuladas apenas com GM-CSF ou em associação com ATRA. Podemos observar uma predominância de células monocíticas/macrofágicas, principalmente quando utilizamos como estímulo o GM-CSF isolado. Além disso, observamos que o acréscimo de ATRA promove um aumento no número de células granulocíticas em estágios mais avançados de diferenciação. As setas pretas indicam os granulócitos em estágios iniciais da diferenciação (Promielócitos e mielócitos) e as setas vermelhas os metamielócitos e granulócitos com núcleo em forma de anel (**Figura 7B**).

Na **figura 7C** estão representados os valores em número absoluto das células precursoras, dos granulócitos e dos monócitos/macrófagos durante a cinética de cultura. É possível verificar diferenças significativas entre os animais

AIRmax e os animais AIRmin nos precursores hematopoiéticos aos 3, 5 e 7 dias de cultura nas células da medula óssea estimuladas com GM-CSF ou com GM-CSF+ATRA. A mesma superioridade dos AIRmax também foi observada para os granulócitos e macrófagos nas culturas de 3 e 5 dias para os dois tratamentos utilizados.

Podemos observar nos resultados apresentados na **figura 7C** um maior número de células monocíticas/macrofágicas com relação às outras células. Estes resultados são coerentes uma vez que este sistema de proliferação e diferenciação *in vitro* está sendo estimulado com o GM-CSF que estimula as células progenitoras da medula óssea a diferenciarem-se em granulócitos e macrófagos (METCALF et al., 1982; ZHU et al., 2001).

Estes resultados confirmam aqueles obtidos com a análise por citometria de fluxo onde verificamos diferenças significativas a favor dos animais AIRmax nos precursores mielóides e macrófagos nas culturas de 3 e 5 dias com as marcações CD11b/GR1 (CD11b^{low}/GR1⁻, CD11b^{high}/GR1^{neg-low}, CD11b⁺/GR1⁺) e CD38/GR1 (CD38^{high}/GR1^{neg-low}, CD38^{low}/GR1⁺ e CD38/GR1⁺).

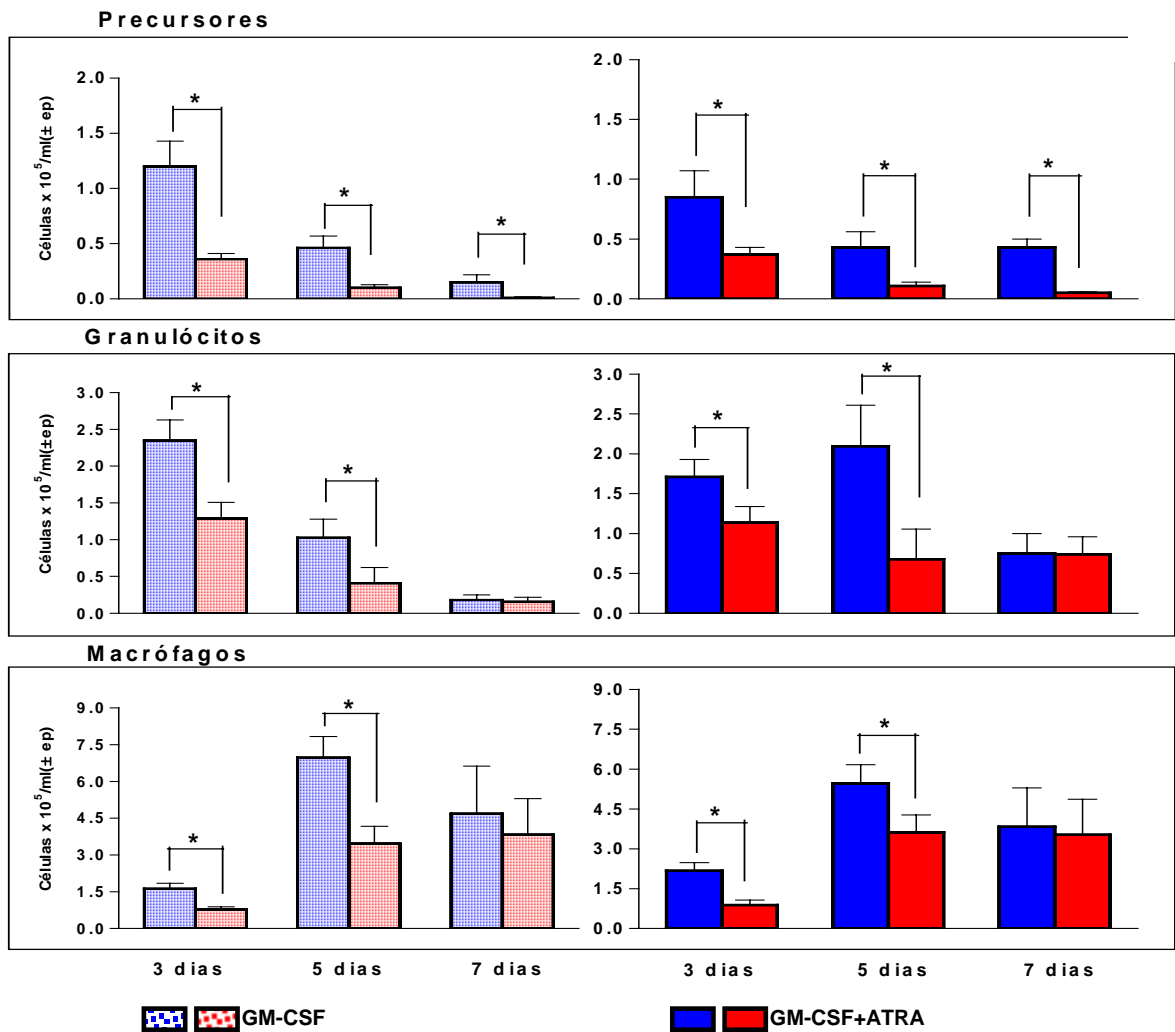
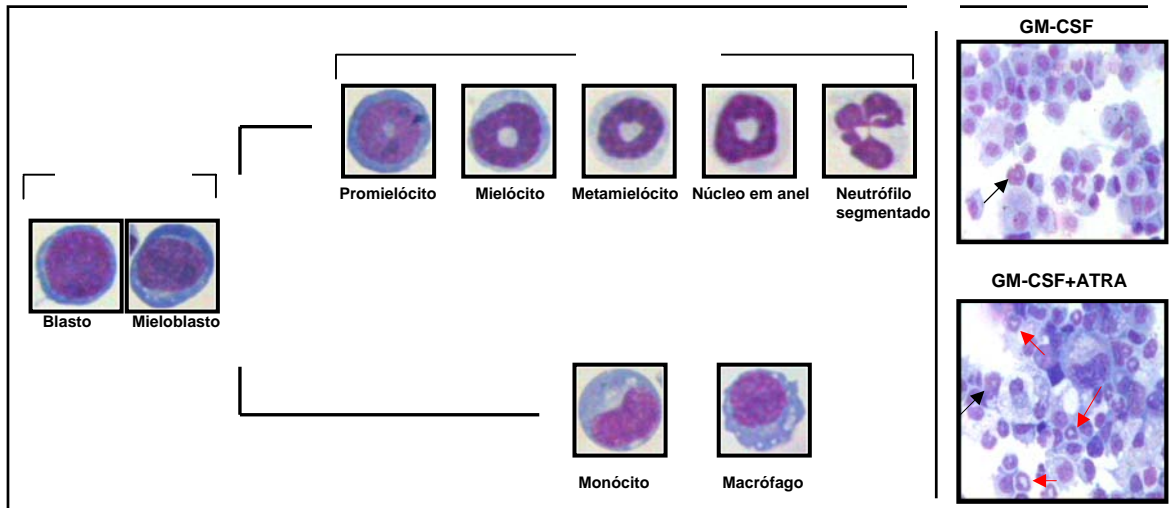


FIGURA 7: A- Morfologia das células precursoras da linhagem mielóide, das diversas fases de maturação neutrofilica (Granulócitos) e de monócito e macrófagos, obtidas nas culturas das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin. B- Aspecto geral da cultura das células da medula óssea estimulada com GM-CSF e GM-CSF+ATRA. As setas pretas indicam granulócitos nos estágios iniciais da maturação e as setas vermelhas indicam os estágios finais ou terminal da diferenciação neutrofilica. C-Contagem diferencial das células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) em resposta a 50ng de GM-CSF e GM-CSF+ATRA a 10⁻⁷M após 3, 5 e 7 dias de cultura. Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos ± erro padrão, N=5. * Diferença entre AIRmax e AIRmin p<0,05.

4.2 Expressão Gênica

Das células da medula óssea estimuladas com GM-CSF ou GM+ATRA foi extraído o RNA total após os períodos de 3, 5 e 7 dias de cultura. A partir deste RNA total purificado, sintetizamos o cDNA por meio da reação de transcrição reversa e adicionamos os *primers* específicos para a amplificação da região de interesse do cDNA. A abordagem da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) para os genes relacionados na **tabela 1**.

4.2.1. Avaliação da eficiência dos *primers* utilizados no estudo de expressão gênica

O experimento de qPCR determina para cada well o número de ciclos no qual a fluorescência intercepta a linha do *threshold* cujo ponto é o valor Ct na fase linear de amplificação. Quanto mais diluída estiver a amostra de RNA, maior será o valor de Ct. Plotando os valores de Ct contra as várias diluições das amostras (diluição na razão 10) o resultado é uma reta cujo coeficiente de correlação (r^2) deve ser maior do que 0,99. Para utilizar o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no cálculo do nível de expressão gênica é necessário que os *primers* tenham eficiência individual próxima a 100%, definida pelo cálculo da regressão linear entre diluições seriadas das amostras de cDNA e o valor individual de ΔCt . A eficiência relativa portanto é determinada pelo *slope* da curva cujo valor absoluto sugerido é menor do que 0,1 (conforme *User Bulletin 2 of Applied Biosystems*, publicado em dezembro de 1997)

A **tabela 1** mostra os valores da eficiência dos vários *primers* utilizados no estudo de expressão gênica. Todos os *primers*, com exceção do CEBP ϵ , apresentaram boa eficiência. Os dados obtidos para o gene CEBP ϵ não foram utilizados neste estudo

4.2.2 Expressão do RNA mensageiro

Na **figura 8** estão representados os valores de variação de expressão gênica em \log_2 dos genes c-myb, MPO e PU.1. A expressão do gene c-myb

apresentou diferença interlinhagens significativa aos 7 dias de cultura nas células da medula óssea estimuladas apenas com GM-CSF e aos 5 dias nas células estimuladas com GM-CSF associado ao ATRA. O gene codificador da MPO teve maior expressão nas células da linhagem AIRmax após 7 dias de cultura para os dois estímulos utilizados, por conta, principalmente de um estado de repressão nas células dos animais AIRmin.

A expressão gênica do PU.1 mostrou-se significativamente maior nas células dos animais AIRmax do que nos AIRmin aos 5 dias de cultura com adição de ATRA. Nas outras condições experimentais não constatamos variações significativas de expressão tampouco diferença interlinhagens.

De uma maneira geral, as diferenças interlinhagens encontradas foi o resultado de ativação ou de supressão gênica, com relação ao perfil do calibrador, nos AIRmax e AIRmin, respectivamente.

Outros genes que atuam na mielopoiese cuja expressão varia conforme a fase de diferenciação celular, também foram pesquisados. Tais como $RAR\alpha$, $CEBP\alpha$, CD11b e MMP-9. Como podemos constatar na **figura 9**, todos os genes apresentaram sua expressão aumentada, de maneira equivalente, com relação aos valores do calibrador, independentemente da condição experimental. Destaca-se o aumento progressivo de expressão do gene $CEBP\alpha$ ao longo de 7 dias de cultura restrita à condição de estímulo associado ao ATRA.

TABELA 1: Seqüência de primers para utilização em qPCR.

Gene	Amplicon (bp)	Primer (5' - 3')	Eficiência (%)*	Slope**
Ciclofilina	115	F: AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT R: AAATGCCCGCAAGTCAAAAG	99,1	
CEBP α	120	F: CCATGTGGTAGGAGACAGAGACCTA R: CTCTGGGATGGATCGATTGTG	99,5	-0,41
c-myb	114	F: AGCAAGGTGCATGATCGTC R: TGGTTGCTGGAAGTGTTCAA	100	0,67
MPO	115	F: GATGACCCCTGCCTCCTC R: CTCGAACAAAGAGGGTGTGC	98,2	0,47
PU.1	142	F: TGTTACAGGCGTGCAAAATG R: TCATGCATTGGACGTTGGTA	98,7	-0,04
CD11b	158	F: CGTGTCCAAAGCTTGGTTTT R: TCCATGTCCACAGAGCAAAG	99,3	-0,13
RAR α	115	F: GACCAGATCACCCCTCCTCAA R: GGTCAGGGTCAGTCCATCT	98,6	-3,15
MMP-9	120	F: CGCTCATGTACCCGCTGTAT R: TGGGACACATAGTGGGAGGT	99,4	-0,10

* Coeficiente de correlação das curvas individuais para cada primer.

** Eficiência Relativa: concentração de RNA versus Δ Ct

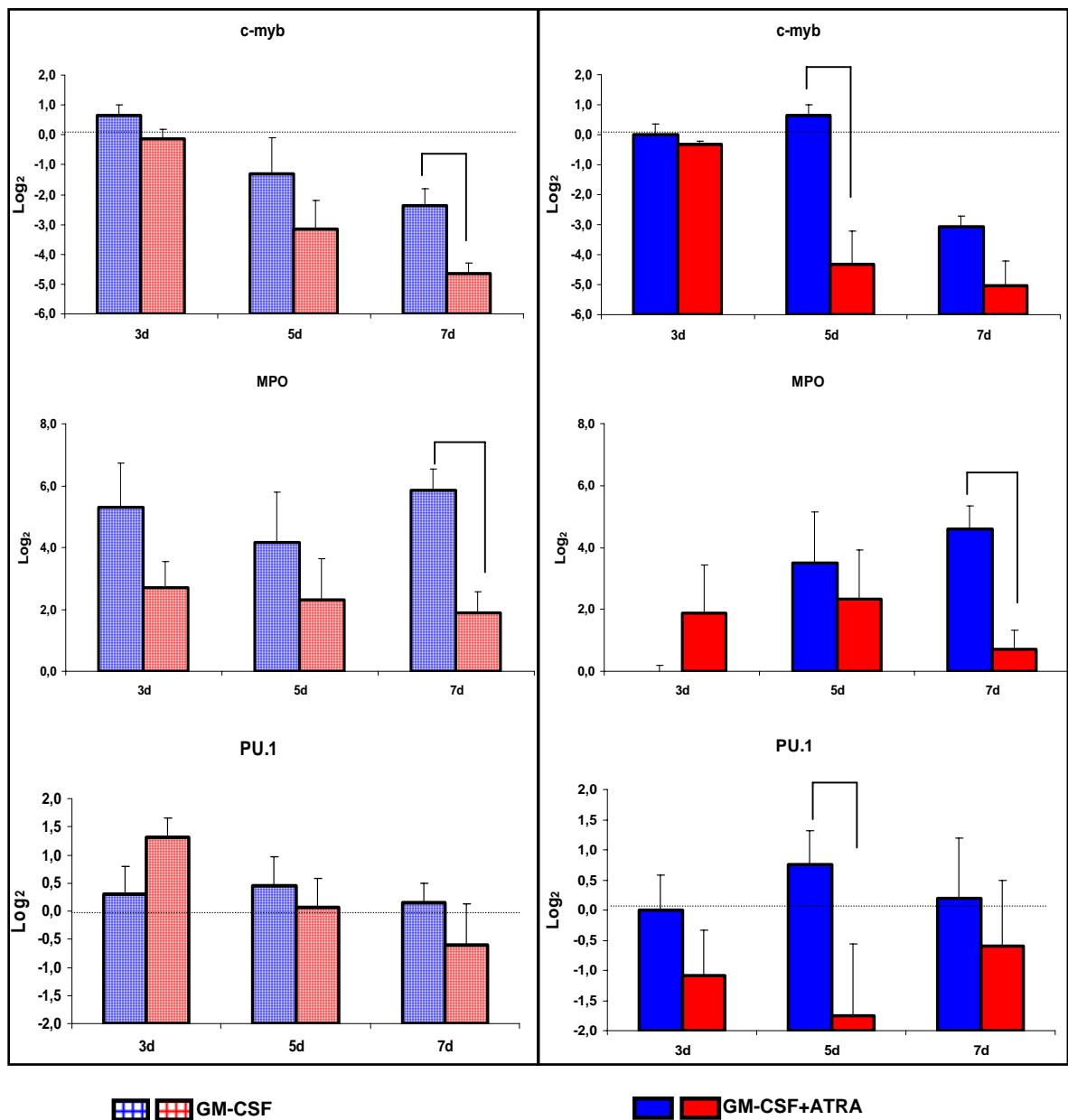


FIGURA 8: Expressão relativa do gene c-myb, MPO e PU.1 nas células da medula óssea dos animais AIRmax (■) e AIRmin (■) em resposta a 50ng de GM-CSF ou 50ng de GM-CSF+ATRA 10^{-7} M após 3, 5 e 7 dias de cultura. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da ciclofilina e calibrados pela expressão das células dos animais AIRmax estimulados por 3 dias com GM-CSF+ ATRA. Valores expressos como média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo. * Diferença entre AIRmax e AIRmin $p < 0,05$.

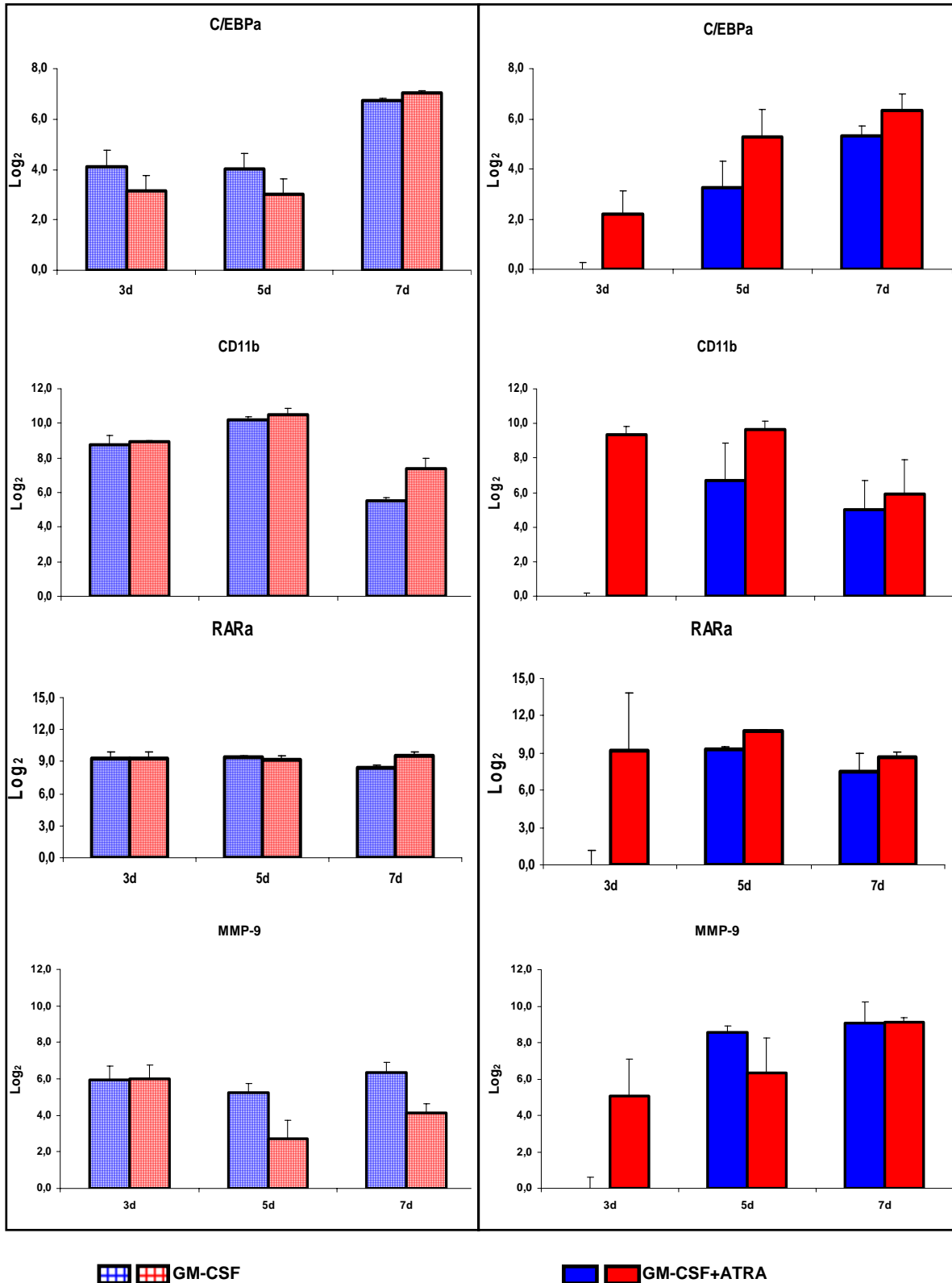


FIGURA 9: Expressão relativa dos genes CEBPa, CD11b, RARa e MMP-9 nas células da medula óssea dos animais AIRmax (■) e AIRmin (■) em resposta a 50ng de GM-CSF e 50ng de GM-CSF+ATRA $10^{-7}M$ após 3, 5 e 7 dias de cultura. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da ciclofilina e calibrados pela expressão das células dos animais AIRmax estimulados por 3 dias com GM-CSF + ATRA. Valores expressos como média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo. * Diferença entre AIRmax e AIRmin $p < 0,05$.

4.3 Análise eletroforética em 2 dimensões das proteínas obtidas das culturas de células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin

Para caracterizarmos a composição protéica dos lisados celulares obtidos das culturas dos animais AIRmax e AIRmin estimuladas com GM-CSF e GM-CSF combinado ao ATRA após 3, 5 e 7 dias de cultura, realizamos experimentos de eletroforese em duas dimensões, em gel de poliacrilamida, conforme descrito em **Material e Métodos**. As quantidades de proteínas utilizadas foram padronizadas em 100 µg, com exceção dos géis referentes às culturas de 3 dias, cujo teor protéico foi 40 µg, devido à baixa concentração protéica nas culturas dos animais AIRmin.

Assim, avaliamos o perfil global das proteínas nos diferentes géis por meio de análise computacional, utilizando o programa ImageMaster 6.0. Este programa possibilitou a identificação de todos os *spots* e gerou um relatório, para cada gel, listando os valores dos parâmetros de intensidade, área e volume, de acordo com o peso molecular (PM) e o ponto isoelétrico (pI) de cada *spot*. Desta forma foi possível estabelecer um perfil de proteínas comparativo entre as células de AIRmax e AIRmin nos três tempos de cultura.

Nesta abordagem escolhemos os *spots* que revelaram diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre AIRmax e AIRmin, indicando a produção diferenciada destas proteínas. Em seguida identificamos as prováveis proteínas presentes nos *spots* por meio de informações obtidas no banco de dados SwissProt, baseando-se pelo peso molecular (PM) e o ponto isoelétrico (pI) de cada um deles. As **figuras 10, 11 e 12** representam os eletroforetogramas em duas dimensões (2D) das proteínas presentes nas células totais da medula óssea de AIRmax e AIRmin obtidas após 3, 5 e 7 dias, respectivamente, do estímulo *in vitro* com GM-CSF associado ao ATRA. À direita dos géis estão representados, em três dimensões, aquelas regiões onde os *spots* apresentaram diferenças interlinhagens nos parâmetros cujos valores estão representados nas **tabelas 2, 4 e 6**.

Nas **tabelas 3, 5 e 7** estão listadas as prováveis proteínas referentes aos *spots* situados na faixa entre 9 e 30 kDa. Estas proteínas pertencem às diversas categorias funcionais, incluindo proteínas de membrana, fatores de crescimento,

proteínas envolvidas na regulação positiva ou negativa do ciclo celular, proliferação celular, citocinese, apoptose, ativação celular, organização do citoesqueleto e moléculas de adesão.

Embora tenha sido utilizada uma quantidade menor de proteína nos géis de 3 dias, estes apresentaram *spots* visíveis, equivalentes àqueles observados nos outros tempos. Além disso, diferenças quantitativas e qualitativas foram evidentes entre os géis de AIRmax e AIRmin, conforme representados nas regiões selecionadas. Este padrão eletroforético foi reproduzido nos tempos subsequentes de cultura onde, mais uma vez, observamos diferenças entre as linhagens.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos nas análises de proliferação e fenotipagem celular, bem como de expressão gênica onde sempre foi observado uma predominância de resposta, ao GM-CSF e ATRA, da linhagem AIRmax. Por outro lado, os géis obtidos com proteínas extraídas das culturas realizadas com estímulo de GM-CSF isolado não mostraram diferenças interlinhagens evidentes, apesar de induzir proliferação diferencial (**Figura 12**). Por isso apresentamos apenas os resultados das análises referentes ao estímulo com GM-CSF associado ao ATRA.

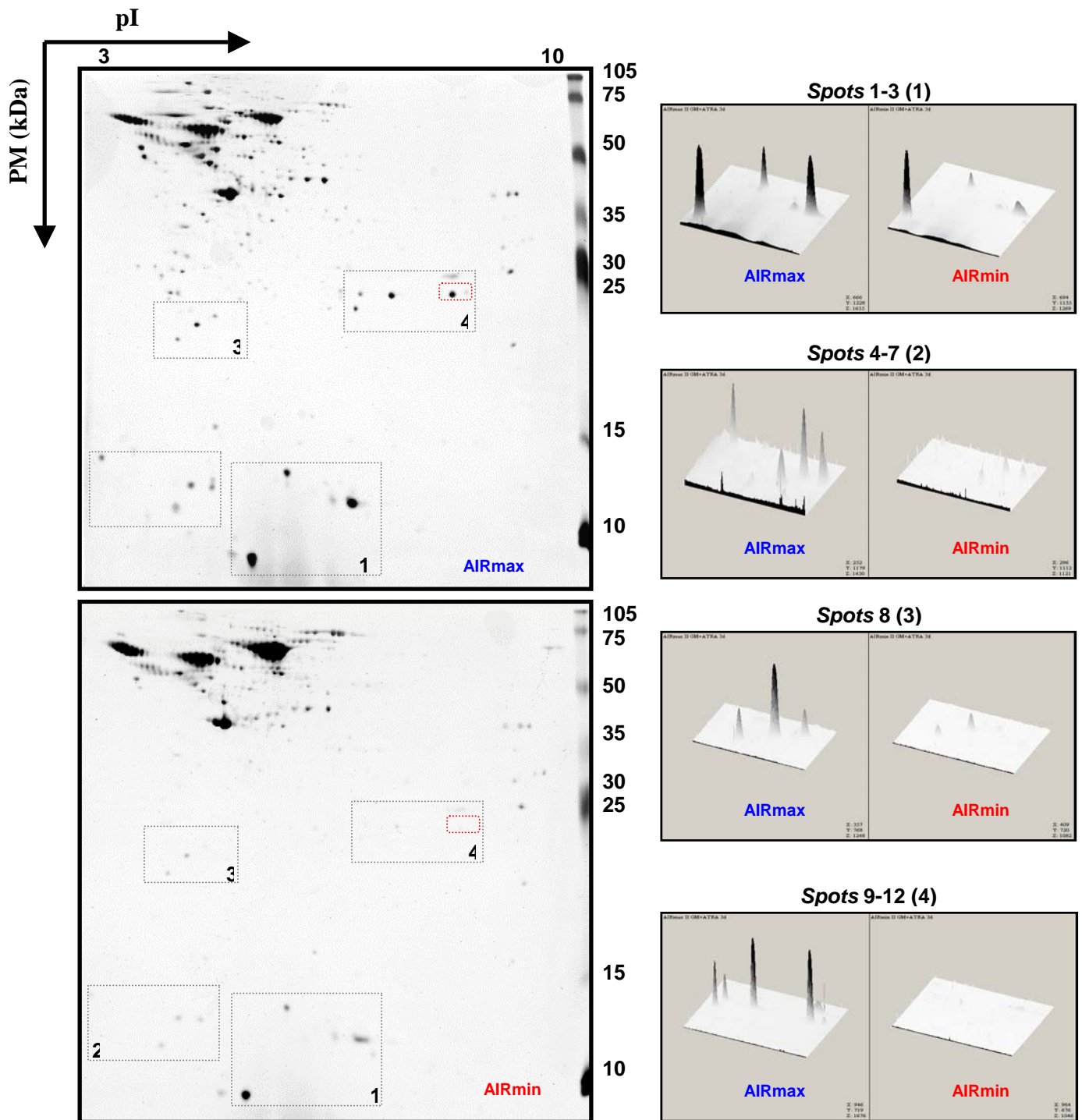


FIGURA 10: Eletroforetograma em duas dimensões (2DE) de 40 μ g de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após **3 dias** do estímulo *in vitro* com GM-CSF associado ao ácido retinóico(ATRA). À direita estão representados, em 3D, regiões que contêm os spots os quais apresentaram diferenças de intensidade entre os géis de AIRmax e AIRmin. Os spots destacados em vermelho correspondem às diferenças qualitativas interlinhagens. Géis representativos de 3 experimentos independentes, N=3.

TABELA 2: Valores de intensidade, área e volume dos *spots* dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **3 dias**, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa ImageMaster 6.0.

<i>Spots</i>	<i>pl</i>	<i>PM</i>	<i>Intensidade</i>		<i>Área</i>		<i>Volume</i>	
			AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin
1	5.69	9.000	2.25	2.00	4.60	2.35	5.26	2.23
2	7.18	12.000	1.88	0.43	3.84	3.35	3.35	0.58
3	6.21	13.000	1.25	0.43	1.84	1.57	0.90	0.25
4	5.10	12.000	0.39	0.12	2.25	1.87	0.33	0.09
5	4.80	13.000	0.50	0.18	2.00	2.00	0.40	0.12
6	4.55	11.000	0.30	0.18	4.20	2.40	0.50	0.10
7	3.46	14.000	0.47	0.09	1.86	1.84	0.34	0.06
8	4.89	21.000	1.08	0.26	1.13	1.00	0.57	0.10
*9	7.23	22.000	0.87	0	0.86	0	0.28	0
10	7.31	23.000	0.51	0.08	1.00	1.26	0.20	0.03
11	7.76	23.000	1.38	0.13	1.48	1.00	1.04	0.05
*12	8.68	23.000	1.41	0	1.53	0	1.09	0

* Diferença qualitativa interlinhagens

TABELA 3: Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **3 dias** na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).

<i>Proteína*</i>	<i>Nº SwissProt</i>	<i>Função</i>	<i>PM(Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Cr</i>	<i>cM</i>
OPRS1 Sigma 1-type opioid receptor	O55242	-proliferação, apoptose, sobrevivência -ativação celular -canal de efluxo de cálcio	25250	5,56	4	-
SCF 2 Stem Cell Factor isoforma 2	P20826-2	- proliferação de células precursoras mielóides ou linfóides	27614	5,01	10	57
LST1 Leukocyte-specific transcript 1	O08843	- <i>Morfogénese celular</i> - <i>proteína de membrana</i>	10325	5,03	17	19,06
S10A6 S100 calcium-binding protein A6	P14069	-Fator de crescimento -Liga cálcio -Regulação do ciclo celular -Proliferação celular	10051	5,31	3	43,60
SYCE2 Synaptonemal complex central element protein 2	Q505B8-2	-ciclo celular -divisão celular -ligação de proteínas	10537	5,34	8	-
GOS2 Putative lymphocyte G0/G1 switch protein 2	Q61585	-ciclo celular	11118	8,56	1	104,1
CKS1 Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1	P61025	-citocinese-divisão celular -ciclo celular	9660	8,89	3	-
CKS2 Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	P56390	-citocinese-divisão celular -ciclo celular	9874	8,07	13	-
APC11 Anaphase-promoting complex subunit 11	Q9CPX9	-citocinese -ciclo celular -Mitose -ciclo da ubiquitina -ligação ion zinco	9818	7,99	11	-

* banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

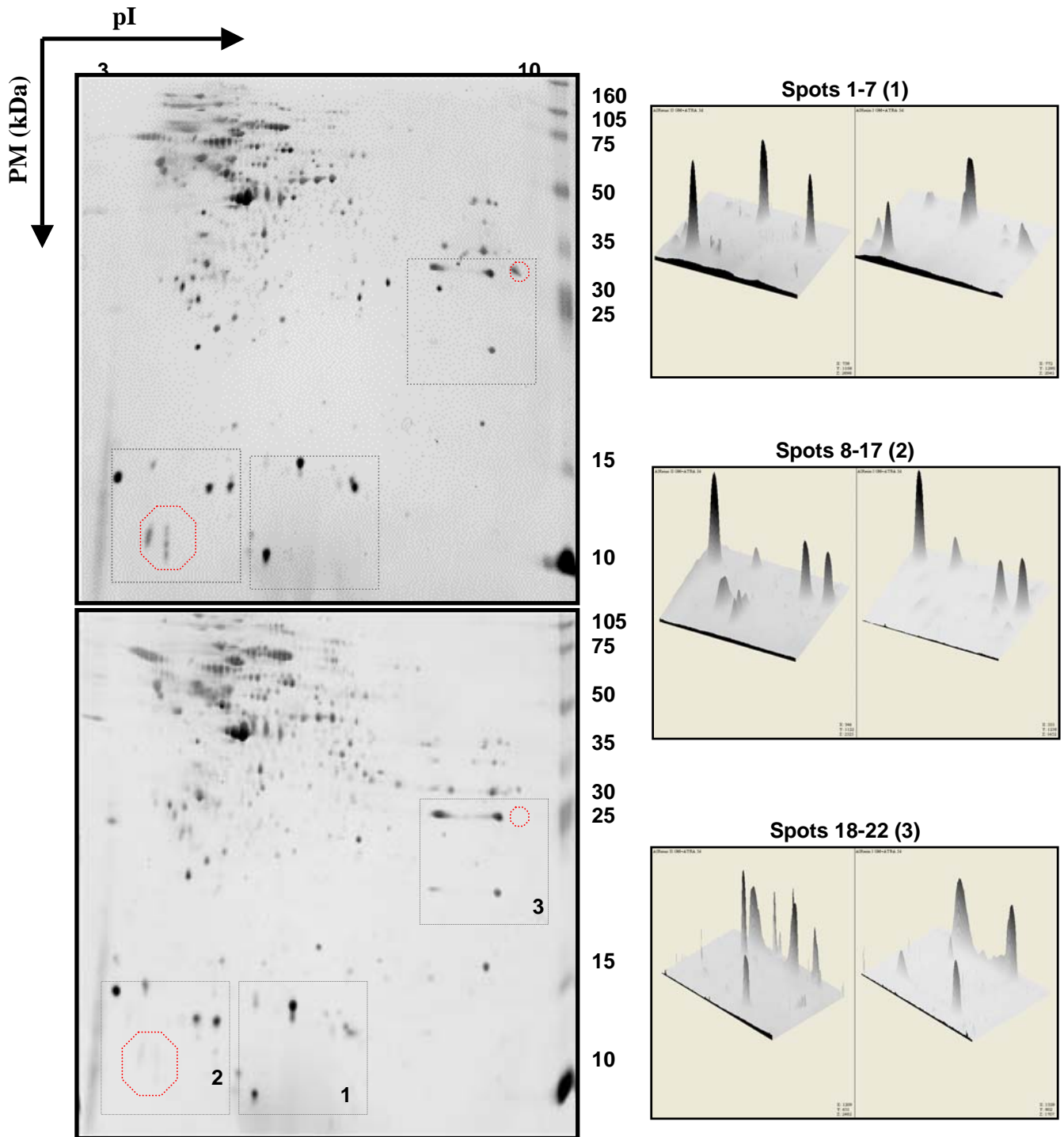


FIGURA 11: Eletroferotograma em duas dimensões (2DE) de 100 μ g de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após **5 dias** do estímulo *in vitro* com 50ng de GM-CSF associado ao ácido retinóico(ATRA) 10^{-7} M.). À direita estão representados, em 3D, regiões que contêm os *spots* os quais apresentaram diferenças de intensidade entre os géis de AIRmax e AIRmin. Os *spots* destacados em vermelho correspondem às diferenças qualitativas interlinhagens. Géis representativos de 3 experimentos independentes, N=3.

TABELA 4: Valores de intensidade, área e volume dos spots dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **5 dias**, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa ImageMaster 6.0.

<i>Spots</i>	<i>pl</i>	<i>PM</i>	<i>Intensidade</i>		<i>Área</i>		<i>Volume</i>	
			<i>AIRmax</i>	<i>AIRmin</i>	<i>AIRmax</i>	<i>AIRmin</i>	<i>AIRmax</i>	<i>AIRmin</i>
1	5.86	10.000	1.93	1.10	4.39	5.20	3.58	2.02
**2	7.25	14.000	1.52	0.56	3.14	6.17	2.24	1.16
3	7.20	14.000	0.82	0.54	2.14	3.06	0.89	0.71
4	6.40	15.000	1.69	1.33	3.68	6.48	3.38	4.56
**5	6.40	15.000	0.34	0.72	1.60	3.23	0.23	1.05
6	5.63	11.000	0.36	0.46	3.38	4.43	0.41	0.71
7	5.29	14.000	1.06	1.07	3.61	5.14	1.77	2.39
8	4.96	14.000	1.16	0.85	3.52	5.39	1.97	1.79
*9	4.29	12.000	0.27	0	1.99	0	0.24	0
*10	4.29	11.000	0.49	0	2.92	0	0.54	0
*11	4.29	10.000	0.44	0	3.13	0	0.50	0
*12	4.01	11.000	0.53	0	3.88	0	0.89	0
13	3.52	15.000	1.80	1.76	4.28	4.65	3.65	3.89
*14	3.57	16.000	0	0.33	0	3.90	0	0.43
**15	6.77	19.000	0.30	0.73	0.80	2.06	0.09	0.67
**17	7.77	27.000	1.31	0.33	1.45	1.34	0.96	0.16
**18	8.59	27.000	1.27	0.34	1.31	1.13	0.85	0.14
19	8.50	22.000	0.16	0.39	2.60	3.04	0.13	0.47
*20	9.47	20.000	0	0.77	0	3.28	0	1.31
*22	7.38	27.000	0.53	0	1.03	0	0.20	0

* Diferença qualitativa interlinhagens

** Diferença quantitativa interlinhagens

TABELA 5: Prováveis proteínas representadas pelos spots dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **5 dias** na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).

<i>Proteína*</i>	<i>Nº SwissProt</i>	<i>Função</i>	<i>PM(Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Cr</i>	<i>cM</i>
LST1 Leukocyte-specific transcript 1	O08843	-Morfogênese celular -proteína de membrana	10325	5,03	17	19,06
S10A6 S100 calcium-binding protein A6	P14069	-Fator de crescimento -Liga cálcio -Regulação do ciclo celular -Proliferação celular	10051	5,31	3	43,60
SYCE2 Synaptonemal complex central element protein 2	Q505B8-2 isoforma	-ciclo celular -divisão celular -ligação de proteínas	10537	5,34	8	-
SKA2 Spindle and kinetochore-associated protein 2	Q9CR46	-requerida para iniciar anáfase na mitose -ciclo celular -divisão celular	13725	5,45	11	-
BORG3 Binder of Rho GTPases 3	Q9Z0X0	-organização do citoesqueleto	15545	6,11	7	-
ARPC5 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Q9CPW4	-organização do citoesqueleto -polimerização da actina -constituinte estrutural do citoesqueleto	16157	5,47	1	-
CYS1 Cystin-1	Q8R4T1	-crescimento celular -regulação da velocidade de crescimento celular	15506	5,22	12	9,0
PSN1 Presenilin-1	P49769	-hematopoiese -crescimento celular	13285	5,42	12	37,0
RGC32 Response gene to complement 32 protein	Q9DBX1	-regulação do ciclo celular	14717	4,67	14	-
SLAF5 Leukocyte differentiation antigen CD84	Q18PI6-2 isoforma	-marcador de progenitor hematopoiético	16174	5,34	1	93,3
TXN4B Thioredoxin-like protein 4B	Q8BUH1	-requerido para a progressão do ciclo celular (S/G2)	16893	5,88	8	-
FL2D Wilms tumor 1-associating protein	Q9ER69-2 isoforma	-regula G2/M -inibe genes WT1 de leucemia	17801	5,42	17	-
JAM1 Junctional adhesion molecule	O88792	Molécula de adesão	29631	5,47	1	93,3
MSLN Mesothelin Precursor	Q61468	Molécula de adesão	27137	5,31	17	-

* banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

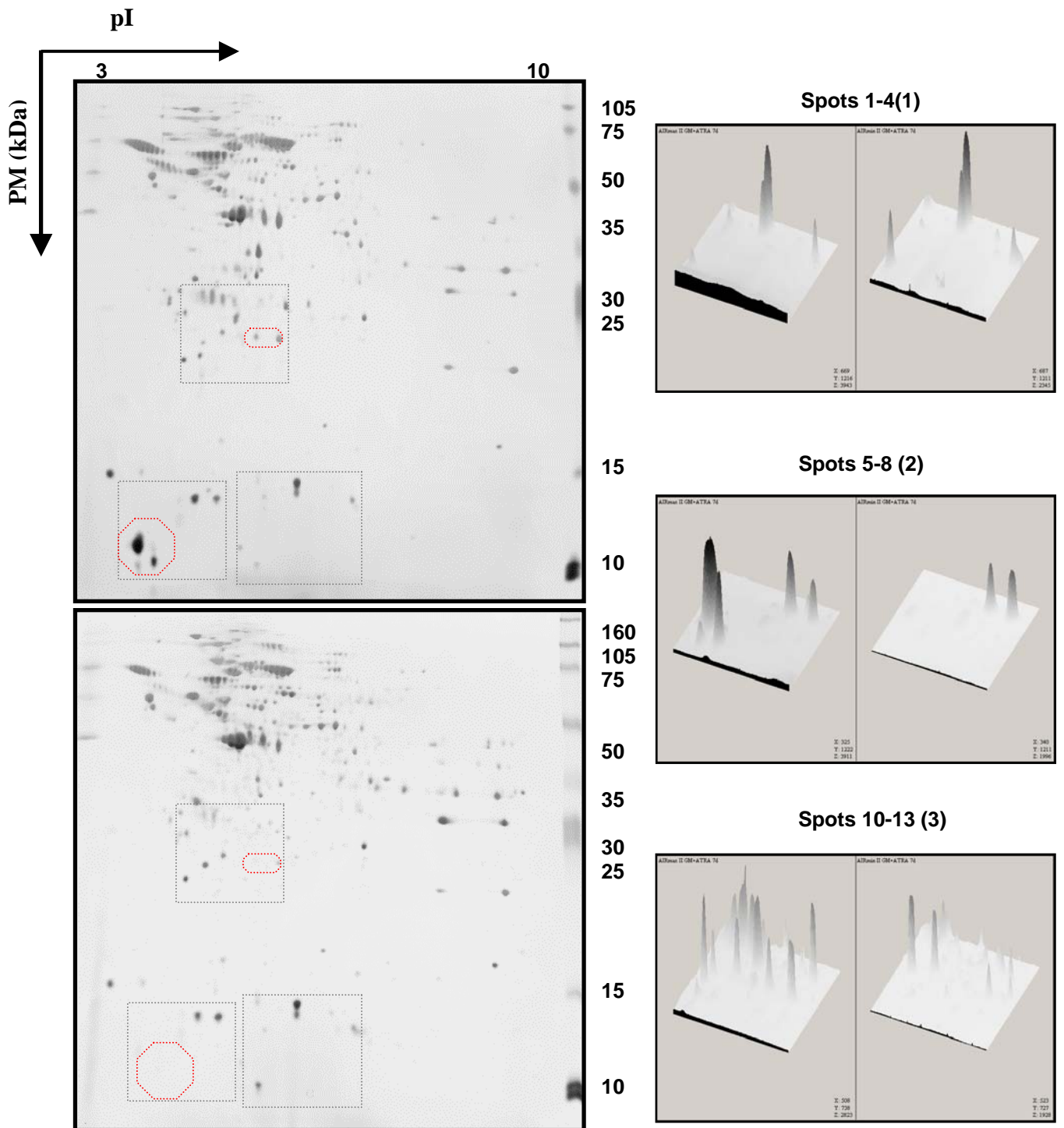


FIGURA 12: Eletroferograma em duas dimensões (2DE) de 100 μ g de proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após **7 dias** do estímulo *in vitro* com 50ng de GM-CSF associado ao ácido retinóico(ATRA) 10^{-7} M. À direita estão representados, em 3D, regiões que contêm os spots os quais apresentaram diferenças de intensidade entre os géis de AIRmax e AIRmin. Os spots destacados em vermelho correspondem às diferenças qualitativas interlinhagens. Géis representativos de 3 experimentos independentes, N=3.

TABELA 6: Valores de intensidade, área e volume dos *spots* dos géis 2D, das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **7 dias**, na presença de GM-CSF associado ao ATRA. Representação de acordo com os dados do programa ImagemMaster 6.0.

<i>Spots</i>	<i>pI</i>	<i>PM</i>	<i>Intensidade</i>		<i>Área</i>		<i>Volume</i>	
			AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin
1	5,70	10.000	0.31	1.00	4.28	2.92	0.36	1.02
**2	7.17	13.000	0.75	0.58	1.94	4.99	0.55	0.93
3	6.32	14.000	1.57	1.66	4.08	3.86	3.53	3.37
4	6.31	14.000	0.98	1.08	2.08	2.53	1.07	1.27
5	5.08	13.000	1.05	1.20	2.67	3.25	1.29	1.93
6	4.74	13.000	1.61	1.13	3.51	3.13	2.65	1.49
*7	4.11	10.000	1.81	0	3.41	0	2.81	0
*8	3.82	11.000	2.32	0	10.32	0	13.36	0
*9	4.82	21.000	1.14	0	1.32	0	0.60	0
10	4.87	22.000	0.60	0.99	1.00	1.87	0.23	1.05
**11	6.04	22.000	0.81	0.43	2.72	1.25	1.24	0.19
**12	6.15	25.000	1.01	0.45	2.80	0.90	1.20	0.15

* Diferença qualitativa interlinhagens

** Diferença quantitativa interlinhagens

TABELA 7: Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis 2D das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas por **7 dias** na presença de GM-CSF associado ao ATRA, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI).

<i>Proteína*</i>	<i>Nº SwissProt</i>	<i>Função</i>	<i>PM(Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Cr</i>	<i>cM</i>
ITA-5 Integrin alpha-5 [Precursor]	P11688	-alfa/beta integrina -sinalização via integrina	17584	9,68	15* *	57,4
RM41 39S ribosomal protein L41, mitochondrial [Precursor]	Q9CQN7	-apoptose -ciclo celular	13887	9,72	2	-
BOREA	Q8BHX3-3	-principal regulador da mitose -estabilização de microtúbulos	18856	9,55	4	57,6
MD2L1 Mitotic spindle assembly checkpoint protein	Q9Z1B5	-ciclo celular -previne o avanço premature de metáfase p/ anáfase	23598	5,17	6	30,3
GEMI Geminin	O88513	-regulação do ciclo celular	23300	4,61	13	-
MFAP4	Q9D1H9	-adesão celular -interação celular	23598	5,09	11	34,35
SNP23 (fam.25) Synaptosomal- associated protein 23	O09044	-fusão de membrana	23261	4,89	2	61,8
E2F6 Transcription factor E2F6	O54917	-ciclo celular G1/S -inibe ciclo celular anormal -fator de transcrição	30882	7,01	12	6,0

* banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

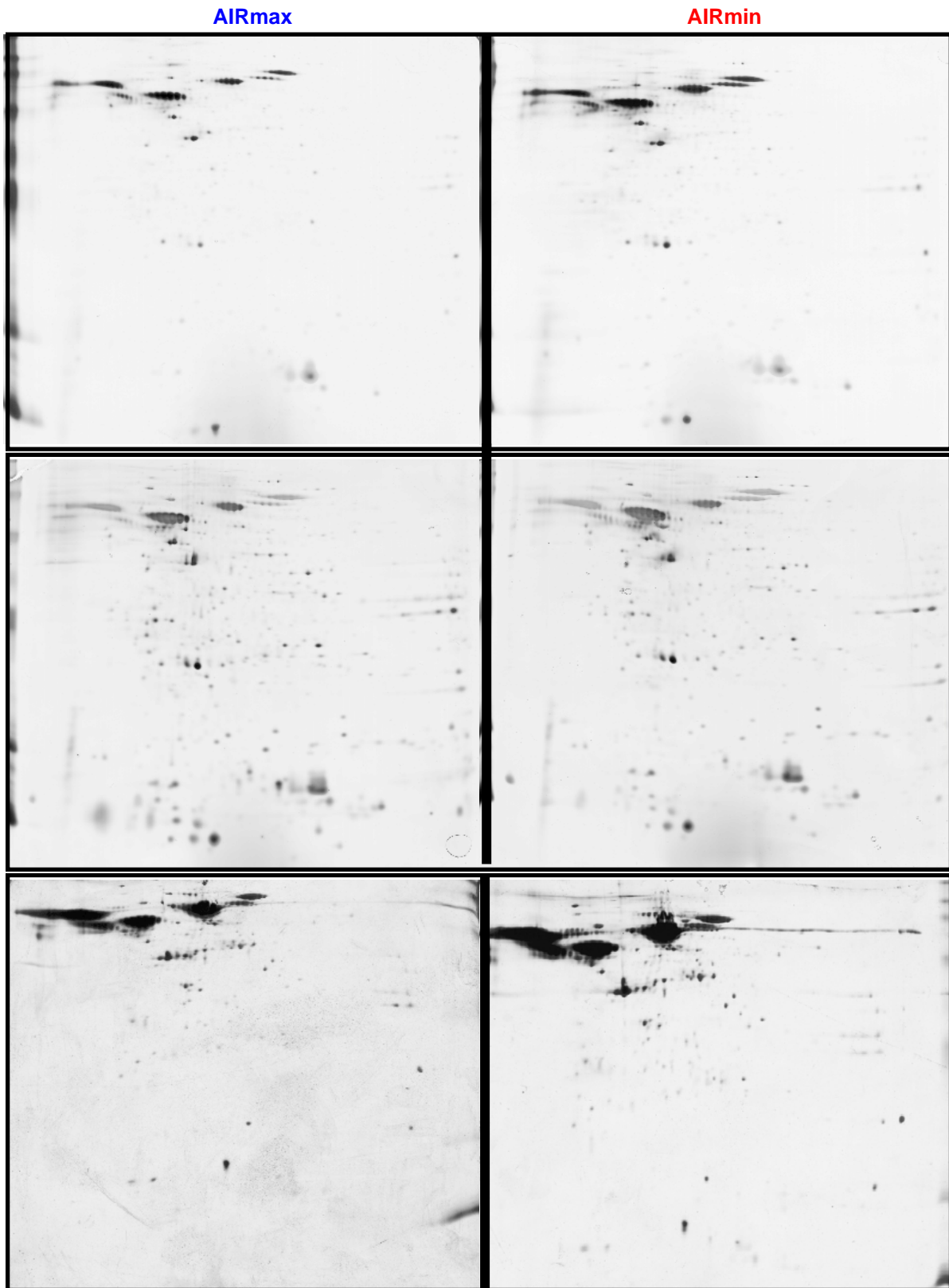


FIGURA 13: Eletroferotograma em duas dimensões (2DE) das proteínas presentes nas células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após 3, 5 e 7 dias de cultura do estímulo *in vitro* com 50ng de GM-CSF sozinho.

4.4 Resposta proliferativa das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin em resposta a diferentes citocinas hematopoiéticas *in vitro*

As células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, apresentaram diferenças interlinhagens em resposta ao estímulo com GM-CSF e GM-CSF associado ao ATRA na proliferação total, perfil de populações celulares e expressão gênica e síntese protéica. Baseado nestes resultados, avaliamos a capacidade da medula óssea destes animais de responderem a outras combinações de estímulos hematopoéticos *in vitro*. Para tanto, as células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin foram cultivadas na concentração de 5×10^5 células/ml por 5 dias à 37°C 5% CO₂ nas seguintes condições de estímulo:

- 1) G-CSF (50ng/mL) + SCF (20ng/mL) combinado ou não ao ATRA 10^{-7} M;
- 2) GM-CSF (10%-sobrenadantes de cultura de células NIH-3T3)+SCF + ATRA 10^{-7} M;
- 3) GM-CSF+G-CSF combinados ou não ao ATRA 10^{-7} M.

Nos resultados apresentados na **figura 14A** verificamos que as células dos animais AIRmax e AIRmin apresentaram níveis de proliferação significantes quando utilizamos, nas combinações, o GM-CSF. Nestas condições, observamos diferenças significativas interlinhagens em resposta ao estímulo com GM-CSF+SCF+ATRA e com GM-CSF+G-CSF+ATRA. Importante salientar que os estímulos apenas com G-SCF associado ou não ao ATRA foram muito baixos (dados não mostrados).

Para pesquisar o nível de diferenciação mielocítica, as suspensões celulares foram submetidas à marcação com os anticorpos dirigidos às moléculas CD38 e Ly-6G/Ly-6C (GR1). Quatro populações distintas puderam ser visualizadas, com os estímulos de GM-CSF+G-CSF com ou sem ATRA, conforme representação na **figura 14B**, cujos fenótipos foram: CD38^{neg-low}/GR1⁻, CD38^{high}/GR1^{neg-low}, CD38⁺/GR1⁺ e CD38⁻/GR1⁺. Assim podemos interpretar um sentido de diferenciação celular nos citogramas a partir da população selecionada abaixo à esquerda e, em sentido horário, até a população abaixo à direita. A população CD38⁻/GR1⁺ contém células em estágio terminal de diferenciação, ou seja, neutrófilos segmentados (RIBEIRO et al., 2003).

Nesta população observamos diferenças interlinhagens significativas a favor dos animais AIRmax na proporção e no número de células para os estímulos com GM-CSF+G-CSF com ou sem ATRA (**Figura 14C**). A adição de ATRA favoreceu o aumento de granulócitos nos animais AIRmax e a diminuição nos animais AIRmin.

Na **figura 14D** observamos a expressão da cadeia α do receptor de IL-3 (CD123) nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin estimuladas por 5 dias com GM-CSF+G-CSF+ATRA, onde verificamos maior expressão desta molécula nas células oriundas dos animais AIRmax do que nos animais AIRmin.

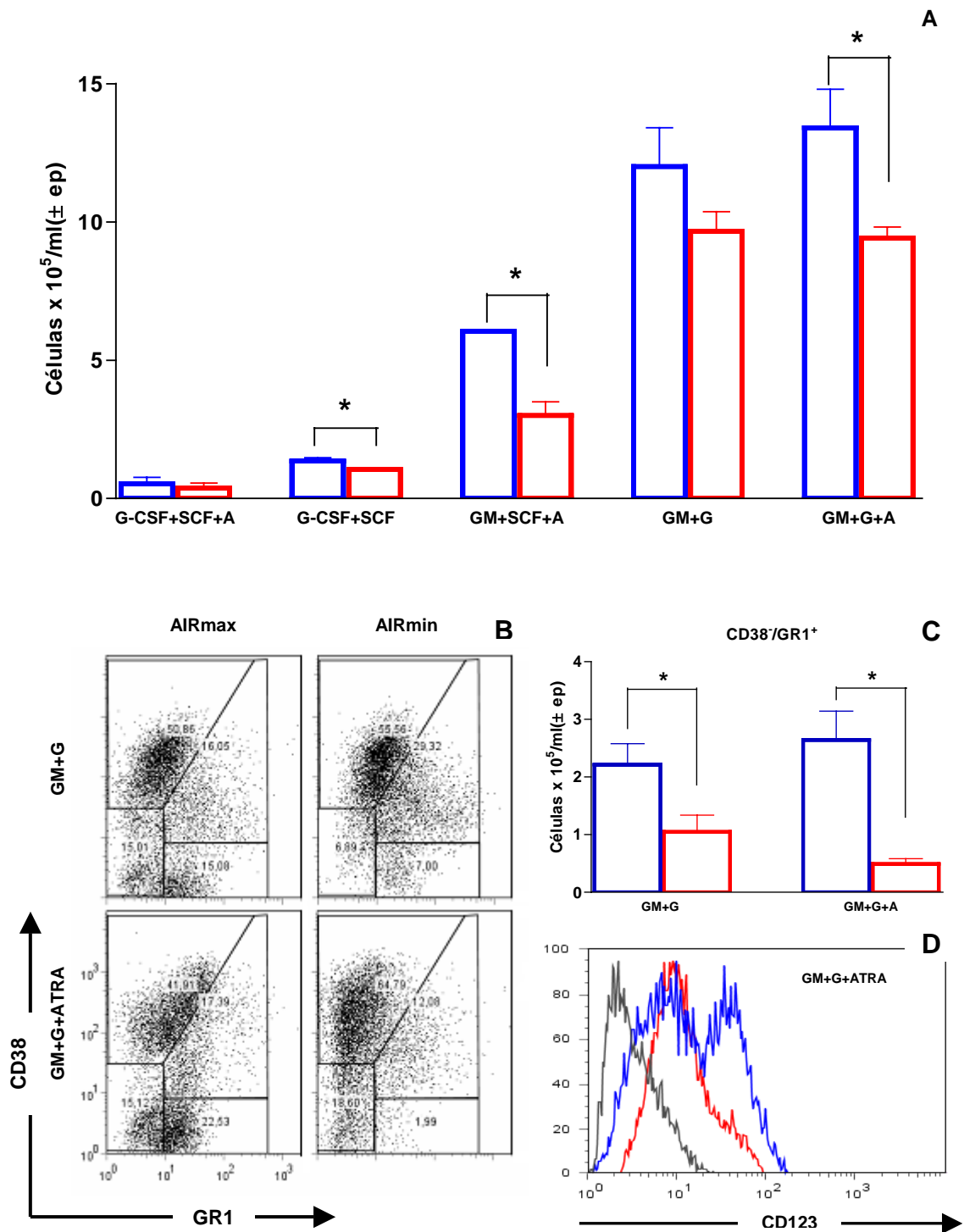


FIGURA 14: Resposta das células da medula óssea a diferentes combinações de citocinas hematopoéticas. **(A)**-Resposta proliferativa das células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 5 dias de cultura a combinações de estímulos com G-CSF, GM-CSF e SCF associados ou não ao ATRA. **(B)** - Caracterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin após 5 dias em resposta ao GM-CSF + G-CSF associado ao ou não ATRA a 10⁻⁷M. **(C)** - Representação dos valores absolutos da população CD38⁺/GR1⁺ nas células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) cultivadas por 5 dias na presença de GM-CSF+ G-CSF com ou sem ATRA. **(D)** - Histograma da expressão de **CD123** nas células da medula óssea dos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), cultivadas por 5 dias na presença de GM-CSF+G-CSF+ATRA. Controle de isótipo (—)Valores expressos como média ± erro padrão. N=3 * Indica diferença entre AIRmax e AIRmin p<0,05.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho documentam as características fenotípicas e genéticas envolvidas no processo de mielopoese dos camundongos geneticamente selecionados para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda ao estímulo provocado pelo biogel P100.

O estudo baseou-se na grande diferença fenotípica entre as linhagens no que concerne à capacidade inflamatória aguda que chega a ser, em termos de células infiltrantes ao sítio de injúria, 25 vezes superior nos animais AIRmax. Desta forma, visamos investigar comparativamente nos animais AIRmax e AIRmin o processo de mielopoese.

Sabendo-se que um dos fatores que determina o maior afluxo de células para o sítio inflamatório dos camundongos AIRmax é a maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros (RIBEIRO et al., 2003), avaliamos alguns aspectos envolvidos na produção de células mielóides em sistema *in vitro*. Dentre eles estão: a capacidade proliferativa das células da medula óssea em resposta ao GM-CSF com ou sem ATRA em tempos variados de cultura, a caracterização fenotípica das células, expressão de genes relacionados com a diferenciação e a presença de proteínas.

Inicialmente realizamos experimentos de cultura de células da medula óssea para estabelecer as doses ideais de estímulo com GM-CSF e ATRA assim como o tempo ideal para a avaliação das culturas em resposta a estes estímulos. Nestes experimentos verificamos que 50ng de GM-CSF isolados ou combinados ao ATRA $10^{-5}M$ ou $10^{-7}M$ corresponderam aos maiores níveis de proliferação celular observados nos períodos de cultura nas duas linhagens estudadas e com diferenças significativas entre elas, nos dias 3 e 5 de cultura. Portanto, para a continuidade do estudo comparativo entre as linhagens, adotamos a dose de 50ng de GM-CSF e ATRA a $10^{-7}M$. Optamos por analisar os três períodos, visto que o tempo em que estas células estão sendo mantidas sob estimulação *in vitro* pode nos indicar as possíveis diferenças na produção de células pela MO comprometidas com a linhagem mielóide.

A produção de células maduras do sangue, a partir de progenitores hematopoéticos na medula óssea, é um processo complexo regulado por fatores de crescimento, os quais agem de forma ordenada e são necessários para a

manutenção das células-tronco e a sua proliferação e diferenciação em linhagens distintas. Fatores específicos, tais como: G-CSF, GM-CSF ou TPO (Trombopoietina) agem como reguladores centrais na produção de neutrófilos, monócitos/macrófagos e plaquetas (METCALF, 2008).

Consistente com dados da literatura os quais destacam o papel das citocinas hematopoéticas e do ácido retinóico na sobrevivência, proliferação e diferenciação dos precursores mielóides na medula óssea (BERLINER, 1998; KASTNER e CHAN, 2001; METCALF e MERCHAU, 1982), observamos que estes estímulos, no nosso sistema *in vitro*, foram capazes de induzir proliferação e diferenciação celular nas duas linhagens. Entretanto, os animais AIRmax responderam mais rapidamente a estes estímulos hematopoéticos, uma vez que, já aos 3 dias de cultura, estes animais apresentaram níveis relativamente altos de proliferação. Um dos fatores que pode estar contribuindo para esta diferença de resposta é a expressão dos receptores para GM-CSF e/ou ATRA na superfície das células desta linhagem.

O GM-CSF promove a proliferação e diferenciação celular pela ligação a seus receptores de superfície, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que resulta na modulação de genes envolvidos na hematopoese. As citocinas GM-CSF, IL-3 e IL-5 ativam pelo menos três vias de sinalização: a via JAK/STAT, a via ras/MAP quinase e a via PI-3 quinase (GUTHRIGDE et al., 1998; SCOTT e BUGLEY, 1999; RANE e REDDY, 2000). Grossman et al em 1999 demonstrou que camundongos deficientes de JAK-3 apresentaram mielopoese prejudicada, levando a um retardamento na diferenciação terminal de células mielóides. Ao contrário, a expressão aumentada de JAK-3 resultou na aceleração da diferenciação celular em resposta a citocinas hematopoéticas (GROSSMAN et al., 1999). Estes estudos demonstraram o importante papel dos receptores de citocinas no desenvolvimento de células mielóides, o que poderia explicar a resposta proliferativa diferenciada das linhagens AIRmax e AIRmin por meio da expressão e/ou sinalização diferenciada destes receptores entre estas linhagens.

De fato, estudos *ex vivo* com células da medula óssea destas linhagens mostraram maior número de células com alta expressão da molécula CD131 na superfície das células dos camundongos AIRmax (RIBEIRO et al., 2003). Esta molécula é a cadeia β comum dos receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5. No entanto, nas nossas condições experimentais, não foi possível detectar a

expressão desta molécula na superfície celular após os três tempos de cultura analisados.

Diferenças significativas na proliferação de progenitores mielóides em resposta ao GM-CSF foram observadas em diversas linhagens de camundongos isogênicos por meio de ensaios de cultura clonal em meio semi-sólido. As células da MO provenientes das linhagens SJL/J e DBA/2J apresentaram níveis elevados de resposta enquanto os animais SWR/J mostraram-se pouco responsivos. Camundongos das linhagens C57BL/6, Balb/c e A/J mostraram níveis intermediários de proliferação dos progenitores mielóides em resposta ao GM-CSF. Esta heterogeneidade de resposta destas linhagens isogênicas é resultado de polimorfismo genético em vários genes relacionados com a resposta ao GM-CSF, SCF e IL-3. Alguns genes estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de leucemias como *Tal1* e *Mllt7* (SOLLARS et al., 2006).

Estas seis linhagens citadas participaram da composição da população fundadora (F0) de seleção dos animais AIRmax e AIRmin, o que poderia, decorrente da fixação diferenciada de alelos, determinar as diferenças na capacidade proliferativa destas linhagens em resposta aos fatores hematopoéticos.

A caracterização das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin estimuladas *in vitro*, que expressam os antígenos de superfície Ly-6G/Ly-6C (GR1), CD11b e CD38 em resposta às citocinas como GM-CSF e o ácido retinóico, foi realizada para identificar as populações celulares produzidas durante a mielopoese. Ao longo do processo de maturação das células mielóides na medula óssea ocorrem mudanças nos tipos de antígenos de superfície ou até mesmo nos níveis de expressão de cada antígeno (ELGHETANY et al., 2004).

As moléculas GR1 e CD11b são compartilhadas pelos neutrófilos e monócitos, mas em diferentes níveis (LAGASSE e WEISSMAN, 1996). Em nossos experimentos verificamos que as culturas dos animais AIRmax apresentaram diferença significativa interlinhagens na produção de células com fenótipo CD11b^{low}/GR1⁻ e CD11b^{high}/GR1^{neg-low} aos 3 e 5 dias de cultura nas células estimuladas com ou sem ATRA. Além disso, após a adição de ATRA às culturas, observamos maior capacidade das células provenientes dos animais AIRmax de diferenciarem-se em células com fenótipo CD11b⁺/GR1⁺ aos 3 dias de cultura.

Diversos estudos demonstraram que os neutrófilos constituem 75% das células da medula óssea com fenótipo GR1^{high} e que a dupla marcação com CD11b, dependendo dos níveis de expressão, revela a presença de células mielóides nos vários estágios de maturação desde blastos imaturos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos até a diferenciação final em neutrófilos segmentados. O fenótipo CD11b⁺/GR1⁻ corresponde aos monócitos ou precursores (HESTDAL et al., 1991; LAGASSE e WEISSMAN, 1996; UEDA et al., 2005). Baseados nestes trabalhos, podemos dizer que os animais AIRmax mostraram maior capacidade do que os AIRmin em produzir precursores mielóides, células em estágios de diferenciação que precedem a maturação neutrofilica e macrófagos/monócitos.

Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, as células com fenótipo CD11b⁺/GR1⁺ caracterizaram células não totalmente diferenciadas em neutrófilos. Apesar deste fenótipo também ser descrito como típico de neutrófilos maduros na medula óssea, sangue e exsudato inflamatório (RIBEIRO et al., 2003), a análise morfológica em microscopia não revelou a presença significativa destas células nos diferentes tempos de cultura.

A marcação com anti-CD38 e anti-GR1 corroborou os resultados obtidos com a dupla marcação, CD11b/GR1, mostrando diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin nos mesmos tempos de cultura e também nos estágios precoces de diferenciação, cujos fenótipos são CD38^{neg-low}/GR1⁻ e CD38^{high}/GR1^{neg-low}. Diferenças nas fases mais tardias da diferenciação celular também foram constatadas com esta marcação, onde células CD38⁻/GR1⁺ foram encontradas em número maior nas culturas dos camundongos AIRmax após estímulo apenas com GM-CSF.

A adição de ATRA às culturas favoreceu o aumento da diferenciação celular, sobretudo nas linhagens AIRmax, onde observamos um aumento no número de células com alta expressão de CD38. Do mesmo modo, estudos com a linhagem celular HL-60, um promielócito com bloqueio na diferenciação celular, mostrou que a incubação destas células com ATRA levou à diferenciação e aumentou os níveis de CD38 (MAREKOVÁ et al., 2003). Este mesmo estudo demonstrou ainda que o ATRA acelerou o processo de apoptose nas células HL-60 mais diferenciadas. Sendo assim, podemos supor que a redução no número

de células diferenciadas (CD38⁻/GR1⁺) quando estimuladas com ATRA poderia ser decorrente de apoptose induzida pelo ATRA.

O GM-CSF estimula a proliferação e diferenciação de células progenitoras multipotentes (BURGESS e METCALF, 1980) e aumenta a expressão de vários genes em resposta ao ATRA, incluindo aqueles sabidamente envolvidos na diferenciação granulocítica (SHIMIZU et al., 2006).

A ação sinérgica do GM-CSF e ATRA induz o aumento da expressão de CD38 (SHIMIZU e TAKEDA, 2000) que contribui para a propulsão da diferenciação induzida pelo ácido retinóico e para a progressão no ciclo celular pela passagem da fase de G0 para G1. Os níveis de expressão de CD38 regulam a resposta das células mielóides ao ácido retinóico, visto que níveis intermediários induzem aumento da diferenciação e altos níveis resultam na perda da viabilidade (LAMKIN et al., 2006). As linhagens AIRmax e AIRmin apresentaram aumento da expressão de CD38 em resposta ao ATRA na concentração de 10^{-7} M de maneira equivalente.

Embora alguns estudos mostrem, em algumas linhagens celulares leucêmicas, que a ação sinérgica de GM-CSF+ATRA induz a maturação neutrofílica, observamos uma baixa proporção de neutrófilos terminalmente diferenciados nas culturas de MO dos animais AIRmax e AIRmin (BERLINER, 1998, LANOTTE, 1991; COLLINS, 1987).

Além da caracterização fenotípica pela expressão de moléculas de superfície celular, as células mielóides também podem ser caracterizadas de acordo com a sua morfologia nuclear e granular. As análises morfológicas das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin corroboraram os dados de citometria de fluxo, com diferenças significativas interlinhagens nos precursores mielóides, nos granulócitos e macrófagos.

Os animais AIRmax e AIRmin diferem grandemente na capacidade de desenvolver resposta inflamatória aguda (IBAÑEZ et al., 1992), apresentam diferenças marcantes na susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções e tumores (ARAÚJO et al., 1998; BIOZZI et al., 1998) e demonstram, ainda, diferenças nos mecanismos que interferem no desenvolvimento de doenças auto-imunes, sendo os AIRmax mais susceptíveis (VIGAR et al., 2000).

A resposta inflamatória aguda diferenciada entre estas linhagens pode ocorrer em consequência da fixação diferencial de genes e/ou da expressão

diferenciada destes genes envolvidos na regulação dos vários eventos celulares e moleculares determinantes da alta ou baixa capacidade inflamatória destes animais.

Um crescente número de genes vem sendo relacionado aos estágios de desenvolvimento mielocítico, pois estes interagem com promotores específicos nos vários estágios de maturação celular (BERLINER, 1998). Alguns genes codificam proteínas dos grânulos e fatores de transcrição envolvidos na mielopoese. A síntese protéica é regulada pela combinação de fatores de transcrição mielóides que, como as proteínas dos grânulos, estão presentes em estágios específicos do desenvolvimento dos neutrófilos (COWLAND e BORREGAARD, 1999; BJERREGAARD et al., 2003).

Estudos em CMPs e linhagens de células leucêmicas mostram que estas possuem um ponto de decisão crítico, onde estão envolvidos os níveis de expressão de genes e fatores de transcrição mielóide, a partir do qual será determinado o destino da diferenciação. Estas células mostram um potencial duplo de diferenciação, ou seja, sob a influência de um determinado estímulo apresentam capacidade de diferenciação neutrofilica e/ou monocítica. O ATRA favorece a expressão de genes nos estágios iniciais da diferenciação mielocítica (COLLINS, 1987; LANOTTE, 1991; LAWSON e BERLINER, 1998; AKASHI et al, 2000).

Avaliamos comparativamente entre AIRmax e AIRmin o perfil de expressão de vários genes envolvidos na mielopoese. Inicialmente analisamos a expressão dos genes c-myb, PU.1 e MPO. A ação sinérgica do GM-CSF e ATRA, aos 5 dias de cultura, induziu expressão diferencial dos genes c-myb entre AIRmax e AIRmin. Esta expressão diferenciada é consistente com os resultados de citometria e morfologia celular que mostram um número maior de células nos estágios iniciais de diferenciação nas culturas dos animais AIRmax em relação aos animais AIRmin.

De fato, o c-myb é descrito como um gene altamente expresso apenas em células mielóides imaturas (KASTAN et al., 1989; WESTIN et al., 1982) e está envolvido na regulação gênica dos neutrófilos, principalmente na transição do estágio de promielócito para mielócito, sendo um gene essencial para o desenvolvimento da hematopoese. Camundongos *knockout* para este gene perdem a capacidade de produzir todas as linhagens hematopoéticas com

exceção dos megacariócitos e conseqüentemente não sobrevivem (OKUDA et al., 1996; MUCENSKI et al., 1991). O c-myb também é requerido para a expressão do gene codificador da MPO e da elastase. A MPO é um importante constituinte dos grânulos primários de neutrófilos (NUCHPRAYOON et al., 1994; OELGESCHLAGER et al., 1996; OLSSON et al., 2004).

A expressão relativa do gene MPO também foi maior nas células dos animais AIRmax e crescente sob a ação sinérgica do GM-CSF e ATRA ao longo da cinética. Por outro lado, nos AIRmin houve uma diminuição de expressão. Este gene também é muito expresso nos estágios iniciais da mielopoese, sobretudo nas células progenitoras CD34⁺ (KLEBANOFF, 1999) e as proteínas produzidas são estocadas nos grânulos azurofílicos e apresentam função bactericida (OLSSON et al., 2004).

O nível de expressão do gene PU.1 também foi diferente entre as duas linhagens, sendo maior nas células oriundas de AIRmax do que naquelas dos AIRmin, aos 5 dias de cultura com GM+ATRA. O PU.1 é expresso ao longo da diferenciação mielocítica e sua expressão aumenta gradualmente nas fases de mielócito e em seguida permanece constante (CHEN et al., 1995). Dekoter e colaboradores em 1998 demonstraram o papel essencial deste gene na progressão da diferenciação de células mielóides em resposta a citocinas hematopoéticas como G-CSF, GM-CSF e M-CSF *in vitro*. Este estudo demonstrou que camundongos deficientes de PU.1 produzem apenas células mielóides nos estágios iniciais da diferenciação, e que estes recuperam a capacidade de produzir células maduras após a transdução retroviral deste gene (DEKOTER et al., 1998)

Estes três genes que apresentaram a expressão aumentada em AIRmax são expressos nos estágios precoces da mielopoese. Os diferentes níveis de expressão podem estar contribuindo para as diferenças interlinhagens quanto à formação de precursores mielóides, monócitos e células comprometidas com a formação de neutrófilos. Além de serem genes críticos nas fases iniciais da diferenciação de células mielóides, modulam também os níveis de expressão de outros genes, principalmente aqueles expressos nas fases iniciais do desenvolvimento mielóide, tais como defensinas e genes codificantes para os receptores de GM-CSF, M-CSF e G-CSF (NUCHPRAYOON et al., 1994; SMITH, 1996; OELGESCHLAGER, 1996; BRITOS-BRAY e FRIEDMAN, 1997).

Por outro lado, não encontramos diferenças significativas na expressão dos genes envolvidos nos estágios intermediário e final da diferenciação mielocítica tais como: MMP-9 (metaloproteinase), CD11b (β 2-integrina) e RAR α (receptor do ácido retinóico) (FARSCHOU e BORREGAARD, 2003). Estes genes apresentaram expressão equivalente entre AIRmax e AIRmin sem qualquer alteração durante a cinética, para os dois estímulos utilizados.

Apesar de não mostrarem diferenças significativas interlinhagens na expressão de RAR α , os animais AIRmax respondem mais a ação do ácido retinóico do que os animais AIRmin e este mesmo perfil também foi observado na diferenciação induzida sem a presença do ATRA. Os RARs podem ser dispensáveis para a geração de neutrófilos maduros, pois camundongos *knockout* produzem neutrófilos maduros, no entanto seu papel parece ser preferencialmente modulador de genes de diferenciação neutrofílica (KASTER e CHAN, 2001).

O gene CEBP α , fator de transcrição que é expresso durante todo curso de produção de células mielóides, apresentou em nosso sistema uma expressão aumentada ao longo da cinética, mas com níveis equivalentes entre AIRmax e AIRmin. Apesar de não apresentar diferenças significativas interlinhagens, este gene é descrito como um fator crítico para a diferenciação de células mielóides (YAMANAKA et al., 1998). O C/EBP ϵ é um fator de transcrição, da mesma família do C/EBP α , que está envolvido na diferenciação de mielócitos, mais precisamente na maturação final de neutrófilos, e possui na região promotora de seu gene um motivo RARE funcional que é alvo do RAR α (PARK et al., 1999; LEKSTROM-HIMES et al., 2001).

Estes dados de expressão gênica, em conjunto com aqueles obtidos de diferenciação celular, demonstraram que os animais AIRmax possuem uma capacidade maior de produzir células precursoras do que os camundongos AIRmin em cultura líquida. Esta característica pode estar refletindo na capacidade dos animais AIRmax em produzir maior número de neutrófilos maduros em condições basais ou na vigência de processos inflamatórios (RIBEIRO et al., 2003).

Os perfis de expressão do RNAm provem uma poderosa abordagem na caracterização das mudanças nos processos biológicos. No entanto esta

abordagem detecta apenas as mudanças em nível transcricional, enquanto que vários genes também sofrem o processo de regulação pós-transcricional, envolvendo a estabilidade do RNAm, início da tradução e a estabilidade da proteína (GYGI et al., 1999).

Além disso, Zheng et al em 2001 demonstrou uma baixa correlação entre os níveis de expressão de RNAm e a composição protéica ao longo do processo de diferenciação neutrofílica em células estimuladas com GM-CSF e ATRA *in vitro* (ZHENG et al., 2001). Outros estudos também mostram evidências de uma baixa correlação entre os níveis de expressão de RNAm e a expressão de proteínas em diversos produtos gênicos envolvidos no processo de diferenciação das células-tronco hematopoéticas (UNWIN et al., 2006).

Alguns fatores podem inibir ou alterar a síntese protéica. Estudos recentes vêm demonstrando altos níveis de regulação pós-transcricional nas células mielóides por meio de microRNAs. Os microRNAs são pequenos RNAs endógenos que podem afetar a expressão gênica após a transcrição por meio da degradação dos RNA mensageiros específicos (BUSHATI e COHEN, 2007). Estas moléculas podem regular negativamente a proliferação e diferenciação de granulócitos. Camundongos deficientes no microRNA 223 (miR^{-/-}), por exemplo, apresentam número elevado de neutrófilos na circulação em consequência de um aumento no número de precursores mielóides na medula óssea. Este fenótipo dos camundongos miR^{-/-} é dado pela regulação pós-transcricional de genes envolvidos na mielopoese pelos microRNAs (JOHNNIDIS et al., 2008).

Sendo assim, consideramos de grande importância analisar o perfil de expressão protéica no sistema de proliferação e diferenciação proposto neste estudo. Assim, pesquisamos diferenças na produção de proteínas pelas células da MO dos animais AIRmax e AIRmin cultivadas na presença de GM-CSF+ATRA. Os resultados mostraram diferenças quantitativas e qualitativas nas diferentes condições de cultura, proteínas estas que podem estar diretamente envolvidas na mielopoese. Além disso, várias das proteínas (spots) detectadas estão presentes nos géis das duas linhagens ao longo de toda a cinética com variações quantitativas entre AIRmax e AIRmin. Este perfil eletroforético constante comprova ainda a sensibilidade e reprodutibilidade da metodologia.

Condizente com o nível de expressão apresentado pelos genes c-myb e PU.1, que exercem um papel central no controle da proliferação celular (GONDA

e METCALF, 1984; SITZMAN et al., 1996; DEKOTER et al., 1998), nossos resultados de proteoma sugerem diversas moléculas envolvidas na hematopoese como aquelas atuantes na sobrevivência e na regulação da diferenciação celular. Estas deverão ser identificadas precisamente por meio de seqüenciamento do conteúdo daqueles *spots* que apresentaram diferenças entre AIRmax e AIRmin.

Baseado nos resultados obtidos em resposta ao estímulo com GM-CSF e ATRA, onde observamos maior produção de células mielóides nos animais AIRmax em relação aos animais AIRmin, realizamos experimentos no sentido de avaliar a resposta das células da MO destes animais a outras combinações de citocinas hematopoéticas.

Apesar do papel do GM-CSF e ATRA na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células mielóides estarem bem estabelecidos, há situações em que a combinação de citocinas pode mostrar maior eficácia na estimulação da proliferação e da diferenciação celular. A ação sinérgica de algumas citocinas pode estimular melhor a proliferação do que a ação de uma citocina isolada (METCALF e NICOLA, 1992; METCALF et al., 2002).

Diferentemente dos resultados obtidos com GM-CSF associado ou não ao ATRA, a combinação das citocinas GM-CSF e G-CSF com ou sem ATRA foi capaz de induzir diferenciação terminal em neutrófilos, como demonstrado pela perda da expressão do antígeno de superfície CD38, indicando que os animais AIRmax são potencialmente capazes de produzir quantidades maiores de células diferenciadas do que os AIRmin.

As citocinas IL-3, G-CSF e GM-CSF possuem propriedades regulatórias na diferenciação das células mielóides, bem como em funções biológicas de motilidade, adesividade e sobrevivência celular. Estes efeitos são mediados pela ligação destas citocinas aos seus receptores expressos nos progenitores mielóides, monócitos, polimorfonucleares e células dendríticas (GUTHRIDGE et al., 1998; SCOTT e BEGLEY, 1999; METCALF e NICOLA, 1983; BERLINER, 1998).

Os animais AIRmax apresentam maior expressão da cadeia β (CD131) comum dos receptores de IL-3, IL-5 e GM-CSF sobre as células GR1⁺ da MO do que os animais AIRmin, *in vivo* (RIBEIRO et al., 2003). No presente trabalho não foi possível analisar a expressão deste marcador, porém, avaliamos a expressão da cadeia α do receptor de IL-3 (CD123) nas células GR1⁺ oriundas das culturas

estimuladas com GM-CSF e G-CSF na presença de ácido retinóico. A maior produção de neutrófilos observada em resposta à combinação de GM-CSF e G-CSF, entre outros fatores e mecanismos, pode estar associada à maior expressão de CD123 sobre as células comprometidas com a diferenciação em granulócitos nos camundongos AIRmax.

Corroborando os resultados obtidos, Ribeiro Filho em 2003 demonstrou a fixação preferencial do alelo normal do IL-3R α na linhagem AIRmax e anormal nos animais AIRmin (RIBEIRO FILHO, 2003). O alelo que codifica a forma protéica anormal é caracterizado pela perda do exon 8 do gene (ICHIHARA et al., 1995), podendo estar associada à baixa expressão do receptor α de IL-3 encontrada nos animais AIRmin em relação aos AIRmax.

Ao longo do processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as linhagens AIRmax e AIRmin. A análise da herdabilidade do caráter durante o processo seletivo, estimou a participação de 9 a 12 loci gênicos independentes com efeito aditivo na determinação da máxima ou mínima resposta inflamatória aguda (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998).

O fato dos camundongos AIRmax e AIRmin terem sido selecionados para fenótipos opostos da resposta inflamatória aguda (AIR), onde admitimos que ocorreu a fixação dos alelos dos genes relacionados ao controle da AIR, possivelmente houve a fixação diferencial de QTLs envolvidos na regulação da mielopoese. Em consequência, os animais AIRmax respondem mais rapidamente a estímulos hematopoéticos e inflamatórios do que os animais AIRmin. Estas modificações teriam consequência na resposta imune inata na vigência de processos infecciosos ou neoplásicos. Além disso, estes animais comportam-se como um modelo adequado para o estudo da mielopoese de maneira alternativa àqueles estudos desenvolvidos em linhagens contínuas de células leucêmicas humanas ou murinas.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

O potencial proliferativo *in vitro* das células da medula óssea dos animais AIRmax é maior do que a dos animais AIRmin, sobretudo aos 3 e 5 dias, após a adição às culturas de GM-CSF associado ou não ao ácido retinóico (ATRA);

As células oriundas dos animais AIRmax, apresentaram maior capacidade de produzir macrófagos, células mielóides em estágios iniciais de diferenciação e células nos estágios que precedem a maturação neutrofilica, em sistema de proliferação controlada;

Os níveis de expressão de genes envolvidos nos estágios iniciais da mielopoese também foi maior nas células dos animais AIRmax;

O perfil protéico obtido das culturas de células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin após 3, 5 e 7 dias revelou diferenças quantitativas e qualitativas de proteínas provavelmente envolvidas na hematopoese.

Referências

REFERÊNCIAS*

- AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I.L. A clonogenic common myeloid progenitors gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, p.193-197, 2000.
- ANDERSON, D.C.; MILLER, L.J.; SCHMALTIEG, F.C.; ROTHLEIN, R.; SPRINGER, T.A. Contributions of the mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: Structure function assessments employing subunit specific monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, v.137 p.15, 1986.
- ANDERSON, K.L.; SMITH, K.A.; PIO, F.; TORBETT, B.; MAKI, R. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. **Blood**, v. 92 p.1576-1585, 1998.
- ANDERSON, K.L.; SMITH, K.A.; PERKIN, H.; HERMANSON, G.; ANDERSON, C.G.; JOLLY, D.J.; MAKI, R.A.; TORBETT, B.E. PU.1 and the granulocyte and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. **Blood**, v.94, n. 7, p.2310-2318, 1999.
- ARAUJO, L.M.M.; RIBEIRO, O.G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W.H.K.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-2920, 1998.
- BAITON, D.F.; UILLYOT, J.L.; FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **J. Exp. Med.**, v.134, p. 907-934, 1971.
- BASKARAN, H.; YARMUSH, M.L.; BERTHIAUME, F. Dynamics of tissue neutrophil sequestration after cutaneous burn in rats. **J. Surg. Res.**, v. 93, p. 88-96, 2000.
- BERLINER, N. Molecular biology of neutrophil differentiation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 5, p. 49-53, 1998.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, n.12, p. 845-59, 2004. Review.
- BIOZZI, G.; RIBEIRO, O.G.; SARAN, A., ARAUJO; L.M.; MARIA, D.A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.K.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, n. 2, p.337-246, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BJERREGAARD, M.D.; JURLANDER, J.; KLAUSEN, P.; BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. **Blood**, v.13, p. 4322-4332, 2003.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, p. 3503-352, 1997.

BURGESS, A.W.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v.56, p.948-957, 1980.

CHANBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J.**, v.10 p.940-954, 1996.

CHEN, H.M.; ZHANG, P.; VOSO, M.T; HOHAUS, S.; GONZALEZ, D.A.; GLASS, C.K.; ZHANG, D.E.; TENEN, D.G. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (spi-1) but not spi-B. **Blood**, v.85, p. 2918, 1995.

CORK, J.M.; PURUGGANAN, M.D. The evolution of molecular genetic pathways and networks. **Bioessays**, v.26, p.479-484, 2004.

COUSINS, D.J; STAYNOV, D.Z; LEE, T.H. Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.150, p.S50-3, 1994.

COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. **J. Leuk. Biol.**, v.66, p.989-995, 1999.

DEKOTER, R.P.; WALSH, J.C.; SINGH, H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. **Embo J.**, v.17, p.4456-4468, 1998

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v.5, p.1317-1327, 2003.

FOUCAR, K. **Bone marrow pathology:** American society of clinical pathologists Academic Press, 1995.

FRAMPTON, J.; RAMQUIST, T.; GRAF, T. V-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. **Genes Dev.**, v.10, p.2720-2731, 1996.

FRIEDMAN, A.D. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. **Oncogene**, v.21, p.3377-3390, 2002.

GERMESHUSEN, M.; BALLMAIER, M.; WELTE, K. Implications of mutations in hematopoietic growth factor receptor genes in congenital cytopenias. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 938, p.305-20; 2001. Review.

GEWIRTZ, A.M.; CALABRETTA, B. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis. **Science**, v.242, p.1303–1306,1988.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v.27, p.927-30, 2002.

GYGI, S.P; RIST, B.; GERBER, S.A.; TURECEK, F.; GELB, M.H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analyses of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nat. Biotechnol.**, v.17, p.994-999, 1999.

GONDA, T.J.; METCALF, D. Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. **Nature**, v. 310, p.249-251, 1984.

GROSSMAN, W.J; VERBSKY, J.W.; YANG, L. Dysregulated myelopoiesis in mice lacking in mice lacking JAK3. **Blood**, v.94, p.932-939, 1999.

HART, J. Inflammation: Its role in the healing of acute wounds. **J. Wound Care.**, v.11, n.6, p.205-9, 2002.

HUBER-LANG, M.; YOUNKIN, E.M.; SARMA, J.V.; RIEDEMAN, N.; MCGUIRE, S.R.; LU, K.T.; KUNKEL, R.; YOUNGER, J.G.; ZETOUNE, F.S.; WARD, P.A. Generation of C5a by phagocytic cells. **Am. J. Pathol.** v.161, n.5, p. 1849-1859, 2000.

HUGUES, B.J; HOLLERS, J.C; CROCKETT-TORABI, E; SMITH, C.W. Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. **J. Clin. Invest.**, v.90, p.1687-1696, 1992.

HESTDAL, K.; RUSCETTI, F.W.; IHLE, J.N.; JACOBSEN, S. E. W.; DUBOIS, C.M.; KOPP, W. C.; LONGO, D.L.; KELLER J.R. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. **J. Immunol.**, v.147, p.22-28, 1991.

IBAÑEZ, O.M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, H.K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O.A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.2555-2563, 1992.

KASTAN, M.B.; STONE, K.D.; CIVIN, C.I. Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage, and proliferation status of normal human hematopoietic cells. **Blood**, v.74, p.517, 1989.

KASTNER, P.; CHAN S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. **Oncogene**, v.20 p.7178-7185,

KIRK, J.A.; REEMS, J.A.; ROECKLEIN, B. A.; DEVANTER, D. R.V; BRYANT, E.M.; RADICH, J.; EDMANS, S.; LEE, A.; TOROK-STORB, B. Benign marrow progenitors are enriched in the CD34⁺/HLA-DR^{lo} population but not in the

CD34⁺/CD30⁰ population in chronic myeloid leukemia: An analyses using interphase fluorescence in situ hybridization. **Blood**, v.86 p.737-743, 1995.

KJELDTSEN, L.; BJERRUN, O.W.; ASKAA, J.; BORREGAARD, N. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate- containing granules. **Biochem. J.**, v.287, p.603-610, 1992.

KOBAYASHI, S.D.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; VOYAICH, J.M.; SCWAN, T.G.; MUSSER, J.M.; DeLEO, F.R. Bacterial pathogens modulate on apoptosis differentiation program in human neutrophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 10948-10953, 2003.

KONDO, M.; WEISSMAN, I.L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v.91, p.661-672, 1997.

LABRECQUE, J.; ALLAN, D.; CHARABON, P.; ISCOVE, N.N.; LOHNES, D; HOANG, T. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha 1 and gamma. **Blood**, v.92, p.607-615, 1998.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophil and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v.197, p.139-150,1996.

LAMKIN, T.J.; CHIN, V.; VARVAYANIS, S.; SMITH, J.L.; SRAMKOSKI, R.M.; JACOBBERGER, J.M.; YEN, A. Retinoic Acid-induced CD38 expression in HL-60 myeloblastic leukemia cells regulates cell differentiation or viability depending on expression levels. **J. Cell. Biochem.**, v.97, p.1328-1338, 2006.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** v.2, n.10, p.787-95, 2002.

LeCABEC, V.; COWLAND, J.B.; CALAFAT, J.; BORREGAARD, N. Targeting of proteins to granule subsets determined by timing not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expresses in HL60 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.6454-6457,1996.

LeCABEC, V.; CALAFAT, J.; BORREGAARD, N. Sorting of the specific granule protein, NGAL, during granulocytic maturation HL60 cells. **Blood**, v.89, p.2113-2121, 1997.

LEHRER, R.I.; GANZ, I.; SELSTED, M.E. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animals cells. **Cell**, v.64, p.229-230, 1991.

LEKSTROM-HIMES, J.A. The role of C/EBP ϵ in terminal stages of granulocyte differentiation. **Stem Cells**, v.19, p.125-133, 2001.

LIVAK, K.L.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2DDCT. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LINK, D.C. Neutrophil role for stromal cell-derived factor-1. **Immunol. Res.**, 3211-3213: p.169-178, 2005

LORD, B.I.; MOLINEUX, G.; PODJA, Z.; SOUZA, L.M.; MERMOD, J. J.; DEXTER, T.M. Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. **Blood**, v.77, p.2154-2159, 1991.

LOTEM, J.; SACHS, L. Cytokine control of development programs in normal hematopoiesis and leukemia. **Oncogene**, v.21, p.3284-3294, 2002.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, H.U. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat. Immunol.**, v.6, p.1190-1198, 2005.

MAREKOVÁ, M.; VÁVROKÁ, J.; VOKURKOVÁ, D.; PSUKA, J. Modulation of ionization radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). **Physiol. Res.**, v.52, p. 599-606, 2003.

MARIA, D.A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H.K.; BARRERA, R.G.; PETTINICHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T.A.; IBAÑEZ, O.M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v.22, p.426-432, 2003.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Advances in Immunology: Innate Immunity. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.338-344, 2000.

MELOTTI, P.; KU, D.H.; CALABRETTA, B. Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-myb. **J. Exp. Med.**, v.179, p.1023-1028, 1994.

METCALF, D.; MERCHAU, S. Effects of GM-CSF deprivation on precursor of granulocyte and macrophages. **J. Cell. Physiol.**, v.112, n.3, p.411-418, 1982.

METCALF, D. Hematopoietic Cytokines. **Blood**, v.111, n.2, p. 485-491, 2008

MOULIN, A.M.; SILVERSTEIN, A.M. In: SHEVACH, J.J.; OPPENHEIM, E.M. **Immunophysiology**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 3.

MUCENSKI, M.L.; MCLAIN, K.; KIER, A.B. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. **Cell**, v.65, p.677-689, 1991.

NUCHPRAYOON, I.; MEYERS, S.; SCOTT, L.M. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, p.5558-5568, 1994.

OELGESCHLAGER, M.; NUCHPRAYOON, I., LUSCHER, B.; FRIEDMAN, A.D. CEBP, c-myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. **Mol. Cell. Biol.**, v.16, p.4717-4725, 1996.

OHL, L.; MOHAUPT, N.; CZELOTH, N.; HINTZEN, S.; KIAFARD, Z.; ZWIRMER, J.; BLANKNSTEIN, T.; HENNING, G.; FÖSTER, R. CCR7 govern skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v.21, p. 279-288, 2004

OKUDA, T.; VAN DEURSEN, J.; HIEBERT, S.W.; GROSVELD, G.; DOWNING, J.R. AML-1 the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. **Cell**, v.84, p.321-330, 1996.

OLSSON, I.; PERSSON, A.M.; STROMBERG, K. Biosynthesis, transport and processing of myeloperoxidase in the human leukaemic promyelocytic cell line HL-60 and normal marrow cells. **Biochem. J.**, v.223, p.911-920, 2004

PARTIDA-SANCHEZ, S.; COCKAYNE, D.A.; MONARD, S.; JACOBSON, E.L.; OPPENHEIMER, N.; GARVY, B.; KUSSER, K.; GOODRICH, S.; HOWARD, M.; HARMSEN, A.; RANDALL, T.D.; LUND, F.E. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. **Nat. Med.**, v.7, n. 11, p.1209-1216, 2001.

RANE, S.G.; REDDY, E.P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. **Oncogene**, v.19, p. 5662-5679, 2000

RATAJCZAK, M.Z.; PERROTTI, D.; MELOTTI, P. Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells. **Blood**, v.91, p.1934-1946, 1998.

RIBEIRO FILHO, O.G. **Controle Genético da Inflamação**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

RIBEIRO FILHO, O.G. **Inflamação e Granulopoese**: Aspectos funcionais e genéticos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

RIBEIRO, O.G.; MARIA, D.A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W.H.K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O.M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v.74, n.4, p. 497-506, 2003.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W.H.; MARIA, D.A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V.R.; STAROBINAS, N.; SEMEN, M.; IBAÑEZ, O.M. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. *Exp. Lung Res.*, v. 31, n.1, p.105-16, 2005.

SERBINA, N.V.; JIA, T.; HOHL, T. M.; PAMER, E. G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.*, v.26, p.421-52, 2008.

SHIVDASANI, R.A.; ORKIN S.H. The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood**, v.87, p.4025-4039, 1996.

SHIMIZU, T.; TAKEDA, K. Induction of retinoic acid receptor α by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human myeloid leukemia cell lines. **Cancer Res.**, v.60, p.4544-4549, 2000.

SHIMIZU, T.; ESAKI L.; MIZUNO, H.; TAKEDA, K. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances retinoic acid-induced gene expression. **J. Leuk. Biol.**, 80, p. 889-896, 2006

SITZMANN, H.; NOBEN-TRAUTH, K.; KAMANO, H.; KLEMPNAUER, K.H. Expression of B-myb during mouse embryogenesis. **Oncogene**, v.12, p.1889-1894, 1996.

SOLLARS, V.E.; PEQUINOT, E.; ROTHSTEIN, J.L.; BUCHEBERG, A.M. Analyses of expansion of myeloid progenitors in mice to identify leukemic susceptibility genes. **Mamm. Genome.**, v. 17, p. 808-821, 2006

SPRINGER, T.A. Traffic signals on the endothelium for the lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Rev. Physiol.**, v.57, p.827-872, 1995.

SKALNIK, D. G. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. **Gene**, v.284 p.1-21, 2002.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on the endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Rev. Physiol.**, v.57, p.827-872, 1995.

STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v.7, p.221-233, 1990.

STROBL, H.; TAKINOMOTO, M.; MAJDIC, O.; FRITSCH, G.; SCHEINECKER, C.; HOCKER, P.; KNAPP, W. Myeloperoxidase expression in CD34⁺ normal human hematopoietic cells. **Blood**, v.82, p.2069-2078, 1993.

TAVASSOLI, M.; YOFFEY, J.M. Bone marrow structure and functions Liss, 1983.

TAYLOR, P.R; GORDON, S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. **Immunity**, v.19, p.2-4, 2003.

TERSTAPPEN, L.W.M.M.; SAFFORD, M.; LOKEN, M.R. Flow cytometric analyses of human bone marrow. III Neutrophil maturation. **Leukemia**, v.4, p.657-663, 1990.

TERSTAPPEN, L.W.M.M.; HUANG, S.; SAFFORD, M.; LANDSDORP, P.M.; LOKEN, M.R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from

single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitors cells. **Blood**, v.77, p.1218-1227, 1991.

THEILGAARD-MONCH, K.; KNUDSEN, S.; FALLIN, P.; BORREGAARD, N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. **J. Immunol.**, v.172, p.7684-7693, 2004.

TODISCO, E.; SUZUKI, T.; SRIVANNABOON, K.; COUSTAN-SMITH, E.; RAIMONDI, C. S.; BEHM, F.G.; KITANAKA, A.; CAMPANA, D. CD38 Ligation inhibits normal and leukemic myelopoiesis. **Blood**, v.95, p. 535-542, 2000.

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE, G. Inflammation and reciprocal production of granulocyte and lymphocytes in bone marrow. **J. Exp. Med.**, v.201, p.1771-1780, 2005.

UNWIN, R.D.; SMITH, D.L.; BLINCO, D.; WILSON, C.L.; MILLER, C.J.; EVANS, C.A.; JAWORKA, E.; BALDWIN, S.A.; BARNES, K.; PIERCE, A.; SPOONER, E.; WHETTON, A.D. Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. **Blood**, v.107 p.4687-4694, 2006.

VIGAR, N.D.; CABRERA, W.H.K.; ARAUJO, L.M.M.; RIBEIRO, O.G.; OGATA, T.R.P.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v.30 p.431-437, 2000.

YAMANAKA, R. et al. CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis. **Int. J. Mol. Med.**, v.1, p.213-221, 1998.

WANG, N; FINEGOLD, M. J; BRADLEY, A; OU, C.N; ABDELSAYED, S.V; WILDE, M.D; TAYLOR, H.R; WILSON, D.R; DRALINGTON, G.J. **Science**, v.269, p.1108-1112, 1995.

WARREL, R.P. et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with retinoic (all trans retinoic acid). **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p.1385-1393, 1991.

WESTIN, E.H.; GALLO, R.C.; ARYA, S.K.; EVA, A.; SOUZA, L.M.; BALUDA, M.A.; AARONSON, S.A.; SONG-STAAL, F. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, p.2194, 1982.

WOODCOCK, J.M.; McCLURE, B.J.; STOMSKI, F.C.; ELLIOT, C.J.B.; LOPEZ, A.F. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, Interleukin-3, or Interleukin-5. **Blood**, v.90, p.3005-3017, 1997.

ZHANG, D.E.; ZHANG, P.; WANG, N. D.; DARLINGTON, G.J.; TENEN, D.G. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.569-574, 1997.

ZHANG, X.; KLUGER, Y.; NAKAYAMA, Y.; BODDAR, K.; WHITNEY, C.; DETORA, A.; WEISSMAN, S.M.; NEWBURGER, P.E. Gene expression in mature neutrophil early responses to inflammatory stimuli. **J. Leukoc. Biol.**, v.75, p.358-372, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)