

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**PAPEL DO RECEPTOR NOD2 EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA ENXERTO CONTRA
HOSPEDEIRO**

Ramon Lemos Calaça das Neves



2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



PAPEL DO RECEPTOR NOD2 EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO

Ramon Lemos Calaça das Neves

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Adriana Bonomo

Rio de Janeiro

Julho de 2010

PAPEL DO RECEPTOR NOD2 EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO

Ramon Lemos Calaça das Neves

Orientadora: Adriana Bonomo

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

(Dr. Alberto Nóbrega, presidente da banca, UFRJ)

(Dra. Adriana Bonomo, orientadora, UFRJ/INCA)

(Dr. José Marcos Telles da Cunha, UFRJ)

(Dr. Wilson Savino, examinador, Fundação Oswaldo Cruz)

(Dr. Marcelo Bozza, revisor, UFRJ)

Rio de Janeiro

Julho de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Neves, Ramon Lemos Calaça das
Papel do receptor NOD2 em modelo experimental de doença enxerto contra hospedeiro / Ramon Lemos Calaça das Neves – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010
XII, 123 f.:il.; 31 cm
Orientadora: Adriana Bonomo
Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2010.

Referências bibliográficas:f 84-89.

1. Doença enxerto contra o hospedeiro
 2. Imunidade inata
 3. Transplante
 4. Célula dendrítica
 5. NOD2
 6. Hematopoese
- I. Bonomo, Adriana. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Papel do receptor NOD2 no modelo experimental de doença enxerto contra o hospedeiro

O presente trabalho foi realizado na Divisão de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Cancer - INCA, sob a orientação da Prof^a Adriana Bonomo.

AGRADECIMENTOS

Devo começar por agradecer à pessoa mais importante da minha vida, minha mãe. Sem dúvida é a pessoa que eu mais admiro, uma pessoa que tem o discurso em perfeita consonância com suas atitudes, que mostra através de exemplo o que se deve entender por valores. Sinto que todas as burradas que fiz na vida foram ao me afastar do que, com os mais sinceros amor e devoção, me foi ensinado por ela. Talvez eu agradeça tanto, por saber que este agradecimento não é de forma nenhuma um anseio desta mulher, que não espera louros, faz o que faz por total altruísmo e talvez agradecimento não seja a palavra mais correta aqui, mas sim reconhecimento.

Agradeço ao meu pai, que talvez tenha tido seu papel na minha vida subavaliado por mim, em determinado momento. A maturidade, porém, me mostrou o quanto eu devo a ele a admiração que eu tenho pelo conhecimento, e anseio por ele. Sem dúvida é uma das pessoas mais cultas que eu conheço, admiro e hoje, posso dizer que sou fã.

Agradeço aos meus irmãos, Caio e Olavo. É impressionante como se pode ter um sentimento tão similar e de tamanha magnitude por pessoas tão diferentes entre si e que estabelecem relações tão diferentes comigo. Acho que isso faz parte dessa miscelânea genética, no nosso caso, laços que chegam a ser clichê, de tão fortes.

Agradeço ao meu padrasto, Ricardo, que se fez presente na minha vida desde muito cedo e certamente muito do meu caráter (alguma parte boa) foi construído com seu exemplo.

Agradeço a Rosita, minha ex-madrasta, que tenho certeza estará sempre na minha vida. Sua torcida sincera pelo meu sucesso e seu zelo pela minha (nossa) família certamente a tornam uma das pessoas pela qual eu tenho mais carinho.

Agradeço aos meus amigos Borba, Frederico e Thiago. Estes eu ganhei de herança do meu irmão e estão sempre comigo nas horas de lazer, mesmo quando não estão presentes, seus ensinamentos estão. Nossa amizade hoje vai muito

além das noitadas, tenho certeza que nossos respeito e admiração mútuos nos tornam praticamente família.

Agradeço ao meu amigo Alexandre Travassos. Este já não tem como ser considerado “apenas” amigo, já é irmão mesmo, até porque compartilha os sentimentos e características que só um irmão possui. Nosso desejo pelo bem e felicidade um do outro é tão grande quanto o poder que temos de nos irritar mutuamente. Alexandre foi minha herança para Olavo, minha tentativa de retribuir pelos irmãos Borba e hoje somos uma confusão de irmãos de sangue e de vida onde não se sabe mais onde um começa e o outro termina.

Um lugar especial nestes agradecimentos está reservado para Guilherme Barbosa. Este amigo não tem tantos anos de estrada, mas não por isso seja menos querido. Não é exagero nenhum quando eu o chamo de menino de ouro. Eu sempre digo que gosto de ter perto de mim pessoas boas, que dão valor as coisas certas na vida e o Guilherme dá uma lição de generosidade por dia. Consegue o improvável, me fazer contente em dividir até as coisas das quais tenho mais ciúme, mas isto está reservado apenas para você, Guilherme.

Sobre Sylvia Alquéres recai o posto de melhor amiga. Nossos interesses pela vida, ciência e comportamento humano são idênticos e assusta como passamos pelos mesmos percalços, cotidianos, científicos e amorosos ao mesmo tempo. Nossa amizade, porém, está num patamar de comunhão de mentes e sentimentos, acho que ela me entende tão bem quanto eu a entendo e por isso eu lhe agradeço.

Agradeço aos amigos remanescentes do tempo da faculdade, Danielle Pereira, Elisa Koremblum, Fernanda Vieira, Rachel Ribeiro, Felipe Dias, Celso Santana, Rodrigo Coelho e Humberto Martins. Hoje em dia nos vemos tão pouco que parece que moramos em países diferentes (o que é verdade no caso do Humberto). Apesar disso, sempre que nos vemos falamos das mesmas coisas, contamos as mesmas histórias e rimos muito. Tomara que seja sempre assim.

Agradeço a equipe dos laboratórios da medicina experimental do INCA, onde desenvolvi este trabalho, em especial, Ana Mercadante, Heitor, Pollyanna, Suelen e João Luis, que fizeram as jornadas de trabalho mais divertidas.

Agradeço aos funcionários do biotério do INCA.

Agradeço ao técnico radiológico Carlos Aurélio de Oliveira, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado. Sua generosidade e seu comprometimento com o trabalho de qualidade o fazem compreender a importância da pesquisa e o mantiveram firme ao nosso lado, após seu horário de trabalho, irradiando camundongos para um propósito que ele desconhecia ao certo. Além disso eu gostaria de ressaltar a atitude diferenciada deste profissional para com os pacientes. Diferenciada pelo carinho e competência, diferenciada pelo zelo e pela compreensão de que as pessoas ali presentes estavam passando por um dos momentos mais delicados de suas vidas.

Agradeço a Rômulo Galvani, parceiro para experimentos, congressos, Karaokê entre outros. Sua ajuda foi fundamental.

Agradeço a Rômulo Areal, outro integrante do laboratório. Nossa amizade, como toda boa amizade, foi construída com um começo conturbado. Ao longo dos últimos anos temos nos ajudado a enfrentar as adversidades, sem perder o bom humor! No entanto, meu maior débito com ele é científico e operacional. Certamente suas enormes capacidades intelectual e operacional estão presentes neste trabalho, que talvez não tivesse tido sucesso sem a sua presença.

Outro nome de destaque é o de Ana Paula Alves, nossa técnica no laboratório. Não é exagero nenhum dizer que o laboratório não funcionaria sem ela. Eu perdi as contas de quantas vezes meus experimentos gigantescos a submeteram a jornadas de trabalhos subumanas, mas eu nunca ouvi uma reclamação sequer. Agradeço pela dedicação e pelo ouvido amigo que tantas vezes me ouviu praguejar contra a vida!

Agradeço a Bruna Fonseca, pela ajuda com o ensaio no luminex e por ser uma pessoa de exceção, de um tipo improvável, do tipo que eu mais gosto.

Agradeço à professora Claudia Neto Paiva pela revisão do texto desta tese.

Agradeço ao professor Dario Zamboni, pela colaboração neste trabalho.

Agradeço ao professor Pedro Paulo Elsas. Na minha opinião, o título mais valoroso que pode ser concedido a uma pessoa é o de Professor. Não conheço ninguém que mereça mais este título. Foi um prazer e um privilégio poder

participar dos cursos por ele ministrados, os quais, recentemente descrevi como (perdoem o uso da expressão em inglês): “Life changing experiences”.

Por fim, agradeço a minha orientadora, Adriana Bonomo. À sua maneira de proceder eu devo grande parte da minha evolução e maturidade científica. Se hoje eu posso me considerar, um pouco que seja, cientificamente independente, isto se deve a ela.

"... para proceder com inteligência, a inteligência só não basta."
(Fragmento do livro "Crime e Castigo")
Fiódor Dostoiévski

RESUMO

PAPEL DO RECEPTOR NOD2 EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO

Ramon Lemos Calaça das Neves

Orientadora: Adriana Bonomo

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

O impacto do receptor intracelular da imunidade inata NOD2/CARD15, no transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) em humanos, permanece controverso quanto a seu papel como fator de risco independente para o desenvolvimento da doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda. Modelos experimentais descrevem um estudo que demonstra que NOD2 presente nas células hematopoéticas do receptor é importante na proteção contra a DECH aguda quando o doador e receptor são completamente alogênicos ou diferindo apenas em antígenos “menor”. Esta questão foi abordada neste estudo utilizando-se um modelo murino semialogênico de DECH. Demonstramos que células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) de camundongos deficientes em NOD2 protegeram receptores de uma DECH aguda, quando administradas juntamente com as células transplantadas. No entanto, conforme demonstrado por marcadores de superfície e secreção de citocinas, as BMDCs de camundongos deficientes para NOD2 não se mostraram diferentes das células controle. A proteção induzida pelas BMDCs deficientes para NOD2 foi acompanhada por um decréscimo no número de células T efetoras, diminuição do nível sérico de interferon- γ , e um aumento na proporção de células T reguladoras/efetoras. Além disso, foi observada uma pega do transplante mais rápida associada a uma alta concentração sérica de G-CSF. Os dados apresentados neste estudo mostram que as células dendríticas de camundongos NOD2^{-/-} são capazes de regular a resposta das células T e a hematopoese em TCTH alogênico, colocando a molécula NOD2 como um alvo promissor para novas intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Doença enxerto contra o hospedeiro, Imunidade inata, Transplante, Célula dendrítica, NOD2, Hematopoese.

Rio de Janeiro
Julho de 2010

ABSTRACT

ROLE OF THE NOD2 RECEPTOR NOD2 IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF GRAFT VERSUS HOST DISEASE

Ramon Lemos Calaça das Neves

Orientadora: Adriana Bonomo

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

The impact of NOD2/CARD15 intra-cellular receptor of innate immunity in human stem cell transplantation (SCT) remains controversial about its role as an independent risk factor for the development of acute graft versus host disease (GVHD). Regarding experimental studies there is one report showing that NOD2 in the hematopoietic cells of the recipient is important to protect from aGVHD when donor and recipient are either completely allogeneic or congenic for the MHC. We approached this issue by using a semi-allogeneic mouse model of GVHD. We found that bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from NOD2 deficient mice protected recipients from aGVHD, when given together with the transplanted cells. However BMDCs from NOD2 null mice did not seem different from control ones, as ascertained by surface markers and cytokine secretion. NOD2 deficient BMDC-induced protection was accompanied by a decreased number of effector T cells, lower interferon- γ serum levels, and an increase in the regulatory/effector T cell ratio. Moreover a faster engraftment was observed which paralleled high serum concentration of G-CSF. Our data shows that dendritic cells from NOD2 deficient mice regulate T cell response and hematopoiesis in allogeneic SCT, placing the NOD2 molecule as a promising target for novel therapeutic interventions.

Palavras-chave: Graft versus host disease, Innate immunity, Transplantation, Dendritic cells, NOD2, Hematopoiesis.

Rio de Janeiro

Julho de 2010

SUMÁRIO

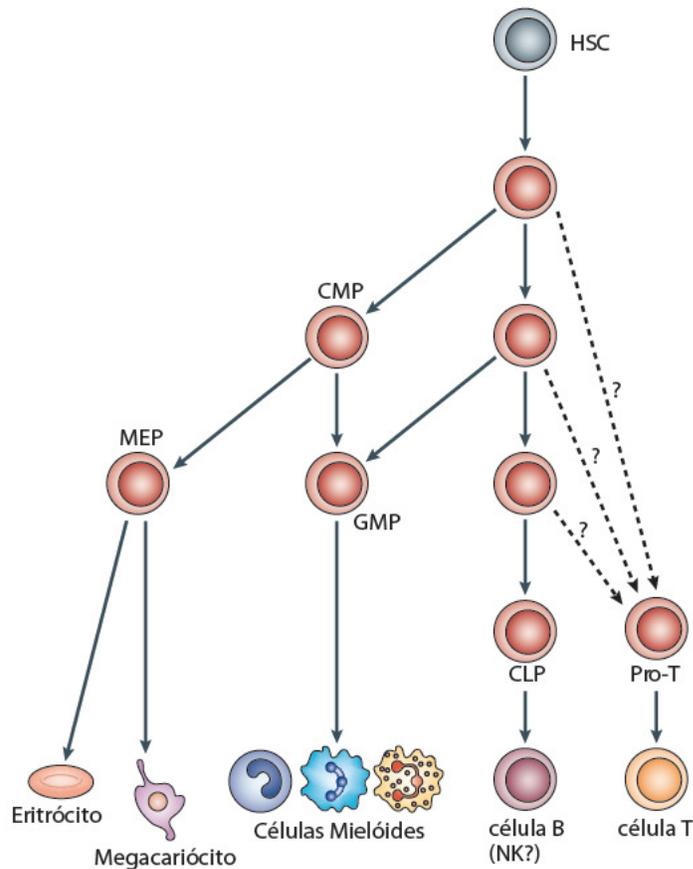
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. O transplante de células tronco hematopoéticas.....	16
1.2. A Doença Enxerto Contra Hospedeiro.....	21
1.2.1. Fase 1, condicionamento.....	22
1.2.2. Fase 2, ativação dos linfócitos T.....	23
1.2.3. Fase 3, efetora.....	23
1.3. A imunidade inata na DECH aguda.....	24
1.3.1. Receptores da família Toll-like (TLR).....	25
1.3.1.1. Vias de sinalização de TLR.....	26
1.3.2. Receptores NOD.....	27
1.3.2.1. Vias de sinalização de NOD.....	28
1.4. Receptores TLR na DECH.....	31
1.5. Receptores NOD na DECH.....	33
1.6. O efeito probiótico na DECH e a homeostase intestinal ligada a resposta inata.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Animais.....	38
3.2. Tampão fosfato.....	38
3.3. Meios de Cultura.....	38
3.4. Contagem de células.....	39
3.5. Medula Óssea.....	39
3.6. Baço.....	39
3.7. Linfonodos.....	40
3.8. Obtenção de macrófagos peritoneais elicitados.....	40
3.9. Purificação de linfócitos T.....	40
3.10. Depleção de células T por complemento.....	40

3.11. Extração de RNA.....	41
3.12. Quantificação do RNA.....	42
3.13. Tratamento com DNase.....	42
3.14. Transcrição reversa.....	42
3.15. Amplificação da região correspondente a NOD2.....	43
3.16. Reação mista linfocitária.....	43
3.17. TCTH e indução de DECH.....	44
3.18. Avaliação clínica da DECHa.....	45
3.19. Avaliação histopatológica da DECHa.....	46
3.20. Geração de células dendríticas derivadas de MO.....	48
3.21. Dosagem de citocinas por ELISA.....	49
3.22. Dosagem de citocinas por multiplex ELISA.....	49
4. RESULTADOS.....	51
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8. ANEXOS.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. O transplante de células tronco hematopoéticas.

Célula tronco é aquela que, por definição, apresenta um fenótipo indiferenciado com capacidade de se dividir por período indefinido, capaz de auto-renovação e de gerar uma progênie de células altamente especializadas (“Haematopoietic Stem Cell transplantation” 2004). Esta definição engloba populações celulares presentes em diversos tecidos com diferentes propriedades funcionais. A população de células tronco presente na medula óssea é responsável pela produção do componente hematopoético do sangue, por isso sendo chamadas de células tronco hematopoéticas (“Haematopoietic Stem Cell transplantation” 2004) (figura 1).



O crescente interesse em células tronco deve-se ao seu potencial terapêutico. Por serem capazes de gerar inúmeros tipos celulares, as células tronco muitas vezes são capazes de regenerar um determinado órgão ou tecido que apresentava suas funções comprometidas, restaurando assim o seu funcionamento normal (Hart & Peggs, 2007; Mendez-Otero *et al.*, 2007; Mimeault, Hauke & Batra, 2007). Isto é o que se almeja com o transplante de células tronco hematopoéticas, restaurar o componente hematopoético de um indivíduo que apresente algum defeito nesse compartimento. Atualmente, o transplante de células tronco hematopoéticas é a alternativa de escolha para o tratamento de diversas doenças, como leucemias agudas, desordens hematopoéticas crônicas, linfomas, doenças auto-imunes refratárias ao tratamento convencional, anemias aplásticas, entre outras (“Haematopoietic Stem Cell transplantation”, 2004).

A utilização deste tipo de transplante como terapia teve sucesso pela primeira vez em 1959 (Baron, Storb & Little, 2003) quando uma paciente portadora de leucemia se submeteu a tratamento radioterápico antes de receber células da medula óssea de sua irmã gêmea. Ficou então constatado que células provenientes da medula óssea são capazes de retomar a hematopoese normal quando transplantados para um receptor irradiado.

Atualmente, o TCTH já está estabelecido como terapia, consistindo basicamente na transferência de CTH de um doador, para um receptor submetido a químico e/ou radioterapia (Quesenberry, Colvin & Abedi, 2005). Existem, entretanto, variações desta técnica, principalmente no que tange a fonte das células tronco, que podem ser autólogas, ou heterólogas, estas últimas podendo ser alogeneicas ou singeneicas (Mickelson, 1999). No transplante autólogo são coletadas CTH do próprio indivíduo a ser transplantado. Estas células são recolhidas e congeladas após o tratamento da patologia de base e serão utilizadas como terapia de resgate, num momento posterior, possibilitando um tratamento químico ou radioterápico mais agressivo. Nos transplantes alogeneicos, as CTH são provenientes de um doador histocompatível, ou seja, que possua identidade com o MHC do receptor. Os transplantes singeneicos consistem em transferir CTH de um irmão gêmeo univitelino para outro.

Outro fator de relevância é a via de obtenção das CTH. As principais vias de obtenção de CTH para transplante em adultos são a punção de medula óssea e o sangue periférico mobilizado com G-CSF (Nervi, Link & Dipersio, 2006). Outra fonte de CTH seria o sangue de cordão umbilical, porém, esta última apresenta uma importante limitação: o número de CTH recuperado é pequeno, sendo na maioria das vezes, insuficiente para transplantar um adulto, mas utilizado para o transplante de crianças (Broxmeyer, 1999; Chao, 2004). Uma alternativa utilizada para esta limitação é a combinação de dois ou mais sangues de cordões umbilicais diferentes, o que geraria número de células suficiente (Lister *et al.*, 2007).

Existem vantagens e desvantagens em cada fonte de CTH. Para a obtenção de CTH da medula óssea o doador é submetido a uma punção da crista ilíaca com posterior aspiração da medula óssea. Este procedimento invasivo é realizado sob anestesia geral e requer a internação do doador. O material obtido neste tipo de procedimento contém de 1 a 3% de CTH e um baixo número de linfócitos T quando comparado ao sangue mobilizado (vide abaixo), o que é interessante, visto que, os linfócitos T seriam os principais responsáveis pelo surgimento de uma posterior doença enxerto contra hospedeiro (DECH), o que será tratado em mais detalhes mais adiante (Gratama *et al.*, 1997). A outra principal fonte de CTH utilizada para adultos é o sangue periférico mobilizado com G-CSF. Neste caso, o doador é submetido a tratamento com G-CSF, um fator de crescimento para granulócitos que altera o padrão de moléculas de adesão das CTHs da medula óssea mobilizando-as para o sangue periférico (Nervi, Link & Dipersio, 2006). Sendo, assim para coletar as CTHs, apenas é necessária uma coleta de sangue por aférese. O produto obtido neste caso contém aprox. 0,5% de CTHs e um número de linfócitos T cerca de 10 vezes maior quando comparado ao material de punção medular.

A preparação do paciente para receber um TCTH, ou regime de condicionamento, varia dependendo da doença de base e entre os centros especializados, mas em termos gerais consiste em radio e/ou quimioterapia para

posterior infusão das CTHs via intravenosa (“Haematopoietic Stem Cell transplantation”, 2004).

A rádio/químio terapia consiste em submeter o receptor a altas doses de radiação ou quimioterápicos, um tratamento que ataca células em proliferação, e visa eliminar as células malignas, que por sua vez apresentam um alto potencial proliferativo. Entretanto o efeito do condicionamento não é restrito a estas células, agindo de forma ampla sobre qualquer célula em proliferação. Sendo assim, outros tecidos, saudáveis ou não, também são atingidos, sendo os que apresentam maior taxa de proliferação os mais afetados (Gratwohl, 2004). É o caso da medula óssea que acaba sendo eliminada com este tratamento, abrindo espaço então para a colonização deste nicho pelas CTHs que serão infundidas no transplante. O tecido epitelial também é muito afetado pela irradiação, sendo neste caso a mucosa gastrintestinal de especial interesse, visto que o rompimento desta barreira propicia o contato de bactérias intestinais com o sistema imune, gerando uma ativação das células da imunidade inata presentes nos tecidos linfóides associados à mucosa intestinal (placas de peyer e linfonodos mesentéricos), ativação esta que já se mostrou deletéria para o paciente (Van Bekkum & Knaan, 1977; Murai *et al.*, 2003; Takatsuka *et al.*, 2003). A administração de antibióticos como profiláticos antes do transplante tem o objetivo de minimizar os danos de possíveis infecções no período pós transplante, visto que o indivíduo passa por uma severa imunossupressão. Entretanto, esta antibioticoterapia pode acabar diminuindo a contagem de bactérias presentes na microflora intestinal do paciente e com isso diminuir os efeitos que esta flora surtiria sobre a imunidade inata do mesmo após o regime radioterápico. A diminuição na contagem bacteriana do conteúdo intestinal diminui também a ativação subsequente do sistema imune, minimizando assim a principal e mais severa intercorrência do TCTH, a doença enxerto contra hospedeiro, tópico que será abordado em mais detalhe adiante (Beelen *et al.*, 1999; Takatsuka *et al.*, 2003). Após esta preparação do receptor ocorre a transferência das CTH obtidas de um doador compatível para o receptor. A infusão é intravenosa e as CTHs viajam através do sangue e chegam a medula óssea, onde encontram um ambiente vazio. Para que ocorra o sucesso no

transplante é necessário que ocorra a chamada “pega” do transplante, o que é caracterizado pela colonização deste nicho pelas CTH transplantadas, restaurando assim a hematopoese normal no indivíduo (Quesenberry, Colvin & Abedi, 2005).

As principais limitações a este tipo de procedimento para transplantes alogeneicos são duas: a identificação de um doador compatível e o controle da doença enxerto contra hospedeiro.

A compatibilidade de tecidos ou órgão para transplantes é determinada pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*), conhecido pela sigla inglesa HLA em humanos e H-2 em camundongos (Janeway, 2002). Este complexo multigênico codifica glicoproteínas de superfície estruturalmente homologas com alto grau de polimorfismo alélico que são responsáveis pelo aceite ou pela rejeição de um transplante (Janeway, 2002). Este fato somado a codominância sob a qual são expressos estes genes torna difícil identificar um doador perfeitamente compatível com o receptor. Estratégias foram traçadas para combater esta limitação, tal como a formação de bancos de doadores de medula óssea, localizados ao redor do mundo e interligados. Esta iniciativa representou um importante passo para a superação deste problema, por exemplo, hoje existe uma chance de 40% de se encontrar um doador que coincida em 10 de 10 genes de HLA para determinadas populações caucasianas européias (Tiercy *et al.*, 2000). Entretanto, esta estimativa varia entre diferentes grupos étnicos, sendo inferior a isso em grupos onde existe maior miscigenação (Samuel *et al.*, 2007). Sendo assim é importante que estes bancos de dados sejam ampliados para que se suplante esta limitação ao TCTH.

Entretanto, o maior problema associado ao TCTH é a doença enxerto contra hospedeiro, que por ser de suma importância para este trabalho será tratada num tópico a parte.

1.2. A Doença Enxerto Contra Hospedeiro

Quando os primeiros TCTH alogeneicos foram feitos, foi mostrado que os pacientes receptores, em sua maioria, desenvolviam uma “doença secundária”. Essa doença tinha como principais intercorrências danos na pele, trato gastrointestinal e fígado e foi posteriormente nomeada doença enxerto contra hospedeiro (Billingham, 1966). Este dano é causado por células T contidas no enxerto que reagem a células apresentadoras de antígeno do receptor, se ativando e iniciando dano no órgão alvo (alorreatividade) (Beilhack *et al.*, 2005). É interessante ressaltar que a DECH pode ocorrer mesmo quando o receptor é aparentado com total coincidência dos alelos de MHC, e ocorre também apesar de todo o regime de imunossupressão a que se submete o receptor após o transplante. Mesmo nestes casos as células T presentes no enxerto ainda são capazes de reconhecer antígenos “minor” do receptor, o que já é suficiente para desencadear uma resposta alogeneica (Flanagan *et al.*, 2001). Apesar das células T serem as responsáveis pela DECH, tentativas de resolver este problema pela depleção destas no material a ser transplantado foram frustradas. Este tipo de procedimento realmente está associado a menor incidência de DECH, porém também apresentam uma falha na pega, acompanhada de recaída da doença base, o que atribuiu aos linfócitos T um valor indispensável no TCTH, modificando conceitualmente o transplante, que deixa de ser apenas uma terapia de resgate e passa a ser um tratamento (Maraninchi *et al.*, 1987; Horowitz *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1998).

Grande progresso no entendimento da DECH foi alcançado com o desenvolvimento de um modelo experimental. As características da doença permitiam que ela fosse didaticamente dividida em 3 fases, que formam um ciclo: fase de condicionamento, fase de ativação dos linfócitos T e fase efetora (Reddy & Ferrara, 2003) (figura 2).

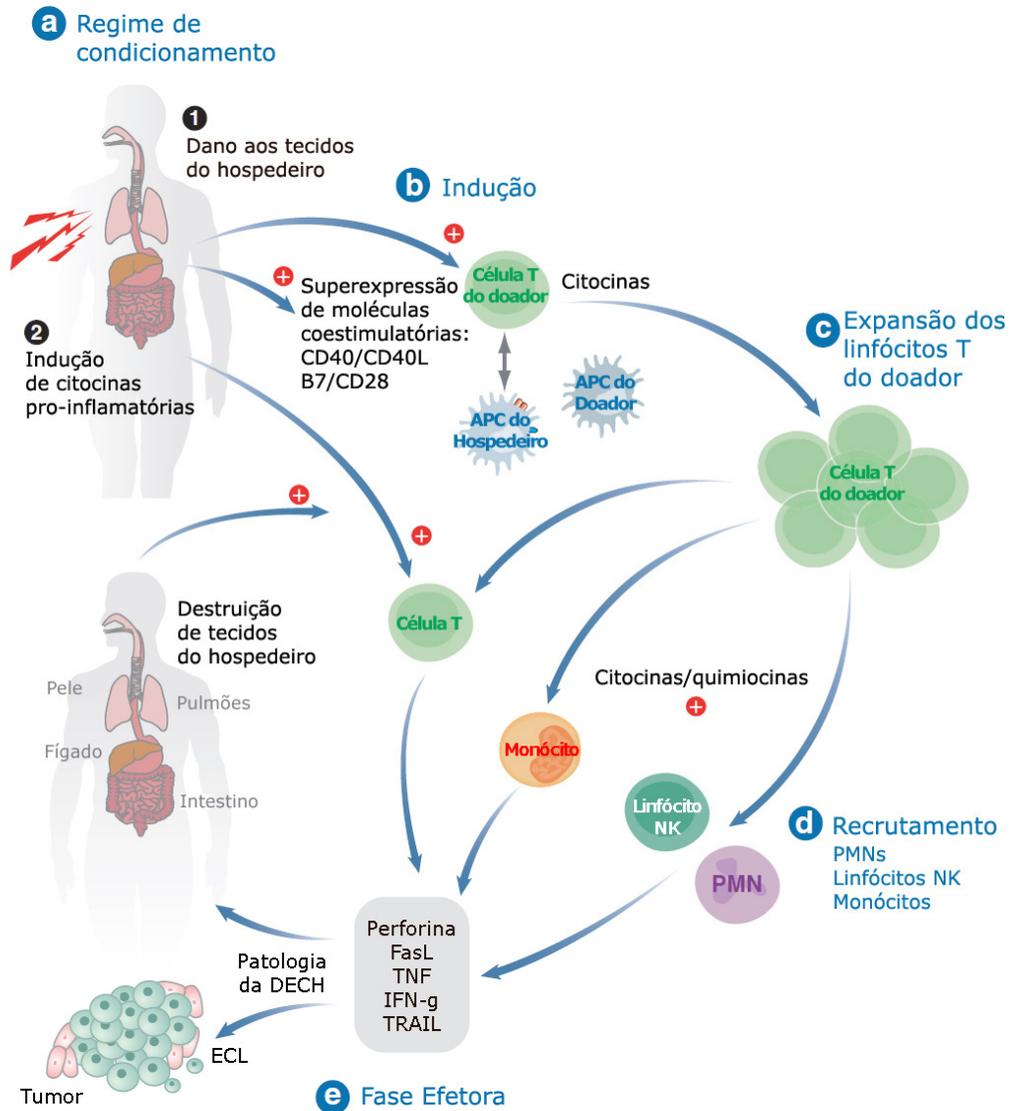


Figura 2: Esquema representativo da divisão da DECH num ciclo de 3 fases (Welniak, Blazar & Murphy, 2007).

1.2.1 Fase 1, condicionamento

Esta fase tem início com o regime de condicionamento e acontece inteiramente antes do TCTH, quando o receptor é submetido à radioterapia mieloablativa. Este tratamento, entretanto, acarreta grande dano a mucosa gastrointestinal, o que termina por gerar a quebra desta barreira ocasionando

extravasamento de bactérias ou seus compostos e a captação destes pelos tecidos linfóides adjacentes (placas de peyer e linfonodos mesentéricos) (Hill *et al.*, 1997). As células da imunidade inata presentes nestes tecidos, principalmente macrófagos e células dendríticas, ao entrar em contato com este material extravasado, se ativam e passam a secretar citocinas (TNF- α , IL-1, etc.) e aumenta em sua superfície sua expressão de MHC e moléculas coestimulatórias (Ferrara, 1998; Cooke *et al.*, 2001; Reddy & Ferrara, 2003). Este ambiente inflamatório é propício para a ativação de células T e será importante para a segunda fase da doença.

1.2.2. Fase 2, ativação dos linfócitos T

Esta fase tem início após a administração do material a ser transplantado. As células T presentes no enxerto encontram o ambiente inflamatório produzido na fase 1 do ciclo, com células apresentadoras de antígeno do hospedeiro exibindo antígenos dos tecidos do hospedeiro em suas moléculas de MHC. Estes antígenos são reconhecidos pelas células T transplantadas em APCs que já apresentam moléculas coestimulatórias em suas superfícies, ativando assim estas células T (Shlomchik *et al.*, 1999). Esta ativação se dá principalmente nos linfonodos mesentéricos e placas de peyer e, num primeiro momento, libera outras citocinas para o sistema (IFN- γ , IL-2, entre outras) que atuam aumentando ainda mais o limiar de ativação da imunidade inata, assim como sobre os próprios linfócitos T, mantendo-os ativados e em expansão (Beilhack *et al.*, 2005).

1.2.3. Fase 3, efetora

Após a ativação dos linfócitos T do doador, estes migram para os órgãos alvo onde desempenham suas funções efetoras. Os linfócitos T CD4 são os primeiros a migrar dos linfonodos e placas de peyer para os seus sítios de ação, seguidos pelos CD8+ (Beilhack *et al.*, 2005). O trato gastrointestinal é severamente atingido ao longo da terceira fase do ciclo da DECH, apresentando crescentes

números de linfócitos T tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, gerando grande destruição neste compartimento e contribuindo tanto para aumentar a quantidade de citocinas produzidas quanto para aumentar o dano na mucosa intestinal, ao liberar mais bactérias para o sistema, o que por sua vez retro-alimenta o ciclo (Cooke *et al.*, 2001). Além do trato gastrointestinal a pele é um sítio preferencial de ação dos linfócitos T e o dano neste tecido acomete quase a totalidade dos pacientes, com lesões que podem evoluir para bolhosas ou ainda necróticas e representam uma fonte importante de infecções. Além de intestino e pele, fígado e pulmões, entre outros, também podem estar envolvidos.

O modelo experimental nos permite investigar melhor a importância de cada fase do ciclo para o desenvolvimento da DECH aguda. A resposta inata tem um papel primordial na primeira fase do ciclo da DECH aguda. Entender como se dão as interações entre o material bacteriano e as células que têm contato com ele pode ajudar a interferir nesta fase do ciclo prevenindo então a DECH aguda.

1.3. A imunidade inata na DECH aguda

A primeira relação entre a ativação da imunidade inata e a DECH foi descrita por Van Bekkum em 1977, quando camundongos “germ-free” foram submetidos a TCTH e mostraram-se incapazes de desenvolver DECHa. Estes mesmos animais, ao terem sua flora reconstituída, apresentaram 66% de óbito. Também já é descrito que a redução da flora intestinal previamente ao TCTH é capaz de reduzir a incidência assim como a severidade da DECH tanto em modelos experimentais quanto no tratamento de humanos (Van Bekkum & Knaan, 1977; Beelen *et al.*, 1999).

Outros trabalhos mostram a importância dos componentes das paredes bacterianas na DECH. Estas estruturas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (do inglês PAMPs) são reconhecidos por uma série de receptores da imunidade inata, gerando uma resposta inflamatória, caracterizada, na maioria das vezes pela ativação do fator nuclear kB (NFkB), levando a

produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-8, etc. (Trinchieri & Sher, 2007).

A ativação da imunidade inata se dá por diversos receptores capazes de reconhecer PAMPs e este reconhecimento é importante para definir como será montada a resposta adaptativa subsequente. A família mais bem caracterizada é a dos receptores “Toll-like” (TLR), mas recentemente outros receptores vêm tendo seu papel melhor caracterizado neste processo, como é o caso dos receptores citoplasmáticos NOD.

1.3.1. Receptores da família Toll-like (TLR)

TLRs são proteínas transmembrana do tipo 1 caracterizadas por um domínio rico em leucinas, responsável pelo reconhecimento de PAMPs, e um domínio citoplasmático homólogo ao do receptor de IL-1, conhecido como TIR (figura 3). Até o momento 11 TLRs humanos e 13 TLRs murinos foram identificados e cada um deles parece reconhecer PAMPs distintos derivados de diversos microrganismos, incluindo bactérias, protozoários, fungos e também de vírus (Akira, Uematsu & Takeuchi, 2006). Os TLRs podem ser divididos em grupos de acordo com o tipo de estruturas que reconhecem. TLR1, 2, 4 e 6 reconhecem lipídios, como é o caso do TLR4, que juntamente com componentes extracelulares como MD-2 e CD14, reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas. TLR2 forma heterodímeros com TLR1 e TLR6 e reconhece uma variedade de estruturas, como peptidoglicana, lipoproteínas e lipopeptídeos de bactérias gram positivas, componentes fúngicos e também de protozoários. TLRs 3, 7, 8 e 9 se localizam no interior da célula associados a vesículas e são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos derivados de vírus e bacterias. TLR3 já foi demonstrado como ligante de RNA de dupla fita, que é produzido por muitos vírus durante seu processo de replicação; TLR9 em motivos CpG de DNA bacteriano e viral enquanto TLRs 7; 8 reconhecem RNA fita simples e alguns RNAs de interferência. OS TLRs 5 e 11 reconhecem proteínas. TLR5 é abundantemente expresso em células CD11c positivas no intestino, onde

reconhece flagelina e o ligante de TLR11 ainda não foi definido, mas este receptor está associado a resposta a bactérias uropatogênicas (Kawai & Akira, 2007).

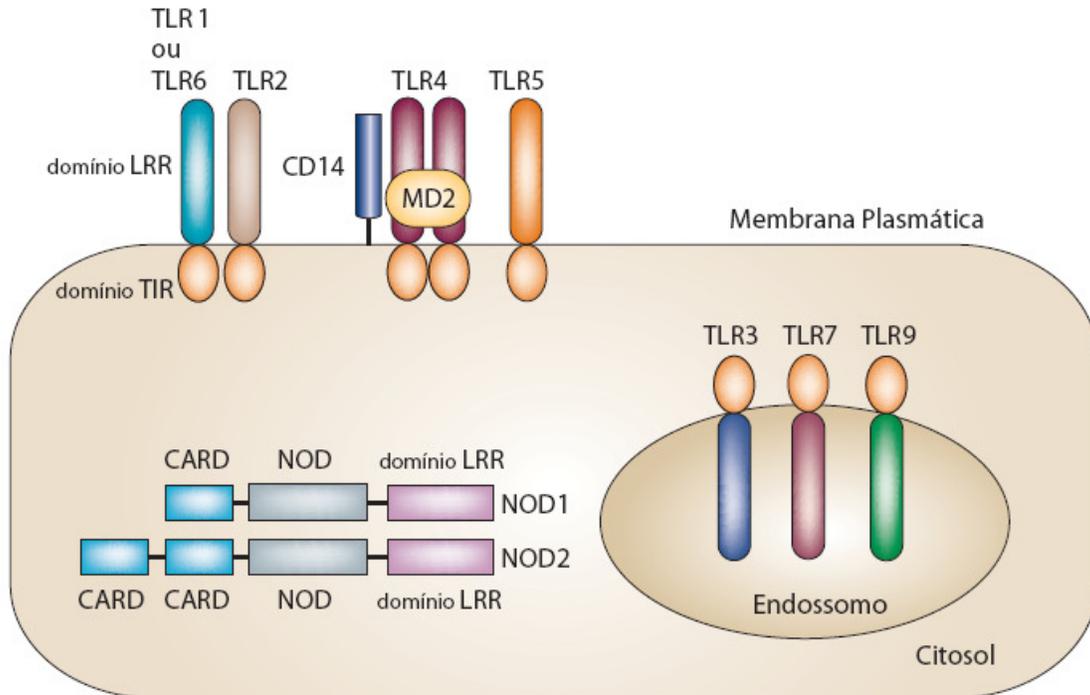


Figura 3: Estrutura e localização dos receptores TLRs e NODs na célula (Strober *et al.*, 2006).

1.3.1.1. Vias de sinalização de TLR

Após o reconhecimento de PAMPs, TLRs ativam cascatas intracelulares que levam a indução de genes de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12. A sinalização de TLRs também induz a produção de moléculas coestimulatórias em APCs, passo crítico para a formação de uma resposta adaptativa dirigida ao patógeno em questão. Além disso, alguns TLRs são capazes de induzir interferons do tipo I, também importantes na geração de coestímulo (Kawai & Akira, 2007).

O engajamento dos TLRs com seus respectivos ligantes estimulam o recrutamento de uma série de moléculas adaptadoras que contém o domínio TIR,

como MyD88, TIRAP (também conhecida como MAL), TRIF (também conhecida como TICAM1) e TRAM (também conhecida como TICAM2) via interações TIR-TIR (Akira & Takeda, 2004). MyD88 é uma adaptadora universal que ativa vias inflamatórias, presente na sinalização de todos os TLRs, com exceção da via de TLR3. O recrutamento de MyD88 leva à ativação de MAP kinases (ERK, JNK, p38) e de NFκB. TIRAP medeia a ativação de uma via dependente de MyD88 em TLR2 e 4, enquanto TRIF ativa uma via alternativa, independente de MyD88 que culmina com a ativação de MAPKs, NFκB e do fator de transcrição IRF3. IRF3 é indutor da transcrição de interferons do tipo I, particularmente IFN-α. TRAM participa desta via independente de MyD88 em TLR4, mas não em TLR3. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de adaptadores para ativar diferentes fatores de transcrição, o que gera uma resposta apropriada e, até certo ponto individualizada, ao estímulo destes patógenos (Kawai & Akira, 2007) (figura 4).

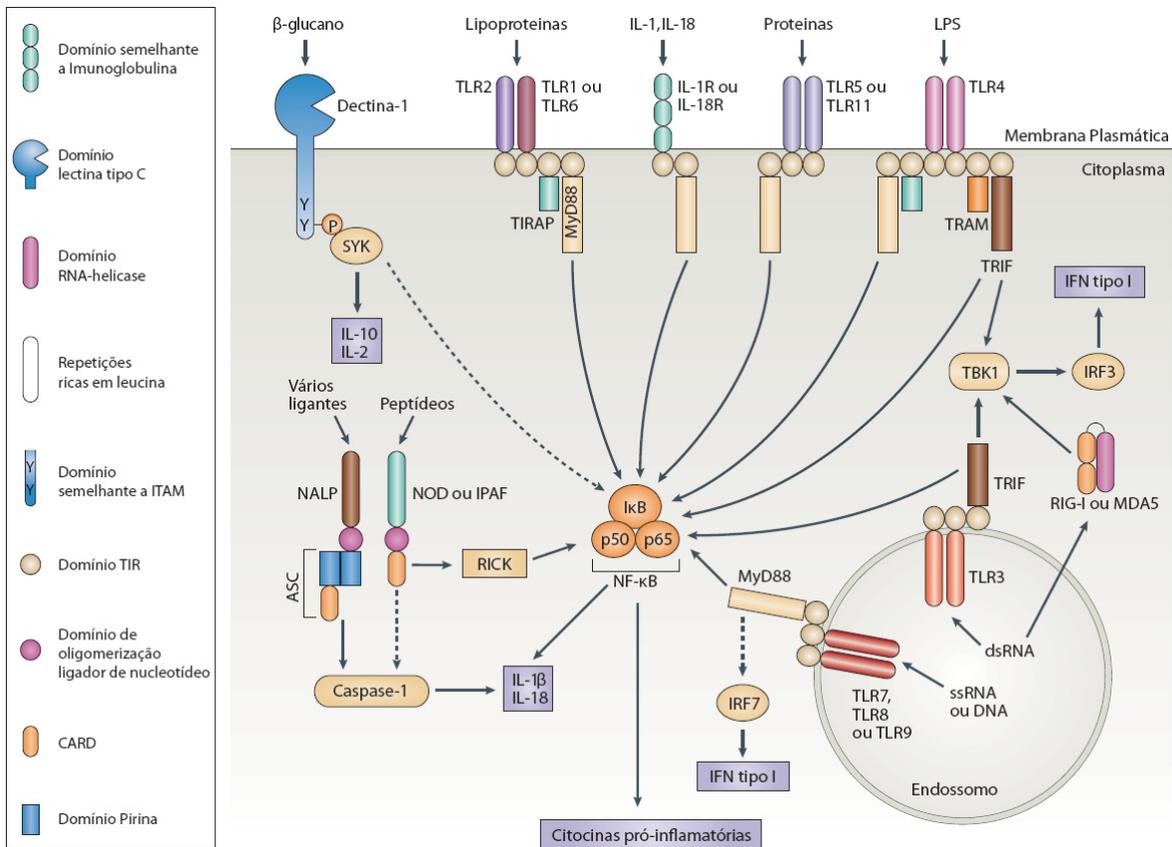


Figura 4: Vias de sinalização utilizadas por TLRs e NODs (Trinchieri & Sher, 2007).

1.3.2. Receptores NOD

Pouco após a descoberta dos TLRs se tornou claro que, apesar de seu papel central na detecção de microrganismos, os TLRs não eram os únicos responsáveis pela completa proteção do hospedeiro. A aparente incapacidade de TLRs em perceber patógenos intracelulares trouxe a possibilidade de outros receptores estarem envolvidos no reconhecimento de micróbios citoplasmáticos (Girardin *et al.*, 2001; O'riordan *et al.*, 2002). Esta ideia ganhou corpo quando observou-se que a forma invasiva de *Shigella flexneri*, mas não sua forma não invasiva, induzia ativação de NFkB (Philpott *et al.*, 2000). Estudos subsequentes identificaram uma proteína citosólica chamada NOD1 como o responsável por essa ativação após a infecção de *S. flexneri*. NOD1 se tornou então o primeiro

membro de uma nova família de receptores, os NLR (“NOD like receptors”) (Girardin *et al.*, 2001).

Em termos estruturais, uma proteína da família NLR possui um C terminal rico em repetições ricas em leucina (LRR), um domínio central de oligomerização (NOD) e um N terminal responsável pela função efetora da molécula, a transdução de sinal (figura 3).

Os primeiros NLRs identificados foram NOD1 e NOD2, já que foi demonstrado que ambos reconheciam muramil-peptídeos derivados de peptidoglicana (PG) (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin, Boneca *et al.*, 2003; Girardin, Travassos *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). PG é um dos principais componentes da parede celular de bactérias gram-positivas, enquanto que em gram-negativas é encontrada em menor quantidade no espaço periplásmico. A PG fornece forma e rigidez à bactéria e é composta por cadeias de açúcares que contém alternadamente *N*-acetil glucosamina (GlcNAc) e ácido *N*-acetil murâmico (MurNAc), interligados entre si por peptídeos curtos (Girardin, Travassos *et al.*, 2003; Boneca, 2005). Foi demonstrado que o receptor NOD2 reconhece muramil-dipeptídeo (MDP), um motivo que está presente na PG tanto de bactérias gram-positivas, quanto na PG de gram-negativas, além de estar presente em diversos imunoadjuvantes (Fritz *et al.*, 2007). Em contraste, o reconhecimento de PG bacteriana por NOD1 é dependente da presença de *meso*-DAP, um aminoácido presente na maioria das bactérias gram-negativas e algumas poucas gram-positivas, como por exemplo, o gênero *Bacillus sp.* Os muramil-peptídeos GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*-DAP (GM-triDAP) e GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala (GM-tetraDAP) foram identificados como produtos bacterianos que são reconhecidos por NOD1 em humanos e em camundongos, respectivamente e a unidade mínima reconhecida por este receptor foi demonstrada como sendo o dipeptídeo D-Glu-*meso*-DAP (Girardin, Boneca *et al.*, 2003; Girardin, Travassos *et al.*, 2003). Em 2006, Uehara e colaboradores mostraram ainda a ativação de células epiteliais humanas através do reconhecimento de *meso*-DAP por NOD1, levando a produção de produtos antibacterianos e citocinas (Uehara *et al.*, 2006).

1.3.2.1. Vias de sinalização de NOD

A expressão de NOD1 e NOD2 está basicamente restrita a dois tipos celulares que estão expostos a e/ou lidam com microrganismos que expressam PG: Macrófagos, células dendríticas e células epiteliais. Tanto em humanos quanto em camundongos DCs e macrófagos expressam tanto NOD1 quanto NOD2, enquanto esta expressão não é observada em linfócitos T ou B.

Uma das principais consequências da ativação de NOD1 e NOD2 por seus respectivos ligantes é a ativação de NFκB. Células epiteliais transfectadas com construtos codificando NOD1 ou NOD2 selvagens, mas não as transfectadas com estes NODs mutados em suas porções LRR, exibem grande mobilização de NFκB para o núcleo (Inohara *et al.*, 2003). Esta ativação ocorre exclusivamente através de uma molécula efetora chamada RICK ou Rip2, como foi demonstrado em transfecção de fibroblastos deficientes em RICK com NOD1 e 2, que resulta em redução severa na ativação de NFκB (Kobayashi *et al.*, 2002). Deve-se notar, entretanto, que macrófagos deficientes em RICK também exibem reduzida produção de citocinas quando estimuladas com LPS e PG, o que sugere um envolvimento de RICK na cascata de sinalização utilizada por TLR2 e TLR4 (Kobayashi *et al.*, 2002).

RICK é uma serina treonina quinase que contém um domínio CARD, domínio este que é responsável por associar-se com o domínio CARD dos NODs através de interações CARD-CARD (Inohara *et al.*, 1999). Como demonstrado por Abbot e colaboradores em 2004, após a ativação por NOD2, RICK medeia a poliubiquitinação de IKKg (ou NEMO) num sítio incomum de ubiquitinação (um resíduo de lisina na posição 285), o que leva a ativação da atividade enzimática desta molécula, levando a ativação de NFκB, através do consumo de seus repressores.

Recentemente, se mostrou que NOD2 ativado (mas não NOD1) também interage com a molécula intracelular GRIM19 e que essa interação pode ser requisito para uma ativação ótima de NFκB. Entretanto nem as bases estruturais

desta interação nem a relação desta com a ativação de NFκB são conhecidas (Barnich *et al.*, 2005).

Outra cascata de sinalização ativada por NODs é a via das MAPK. O estímulo tanto de NOD1 quanto de NOD2 resulta em ativação de p38 MAPK e ERK, levando a ativação de JNK (Girardin *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2005). O mecanismo pelo qual ocorre esta ativação também é desconhecido até então.

Finalmente, a última via de sinalização que teve sua relação com a ativação de NODs revelada através de estudos de coprecipitação, foi a via da procaspase 1. Quando células são transfectadas com construtos que codificam NOD2 e procaspase 1, ocorre a indução de IL-1, através do processamento da proIL1 em IL-1 madura (Damiano *et al.*, 2004). NOD2 pode então, se ligar a procaspase 1 por interações CARD-CARD da mesma forma que se liga a RICK e, com isso, converter a procaspase 1 em caspase 1 (Martinon & Tschopp, 2004) (figura 4). Entretanto ainda não se sabe o valor biológico desta observação.

1.4. Receptores TLR na DECH

Como citado anteriormente, a DECH é dividida em 3 fases que formam um ciclo. Naturalmente, tentativas de tratamento e prevenção da DECH visam interromper este ciclo, agindo sobre uma destas 3 fases. Na tentativa de interromper ou prevenir o surgimento da DECH, alguns pesquisadores objetivaram o estudo do LPS, importante molécula bacteriana que ativa o sistema imune através do engajamento com o receptor TLR4 (Cooke *et al.*, 2002). Esta ativação se mostrou importante para a fase 1 do ciclo da doença, com os níveis de LPS no soro de camundongos se correlacionam em que os níveis de DECH. Hill e colaboradores, em 1997, demonstraram a correlação entre a agressividade do regime de condicionamento e a ativação do sistema imune. Neste trabalho camundongos que recebiam maiores doses de irradiação corporal total apresentavam maior mortalidade pós TCTH devido a DECH. Esta maior severidade da DECH observada era acompanhada de maiores níveis séricos de LPS e de TNF-α. Cooke e colaboradores demonstraram em 1998 que

camundongos submetidos a TCTH onde os doadores eram camundongos C3H/HeJ (que possuem uma mutação na porção LRR do TLR4 que o torna inativo) apresentavam uma redução na mortalidade relativa a DECH, além de apresentarem melhor recuperação após o transplante. Neste mesmo trabalho os autores sugerem o uso destes dois parâmetros como marcadores prognósticos de doença, sendo maiores valores indicativos de piores prognósticos de doença (Cooke *et al.*, 1998).

Em outro trabalho, Cooke e colaboradores utilizaram, em 2001, um antagonista de LPS na tentativa de reverter os efeitos deletérios desta molécula na DECH. De fato, animais submetidos a TCTH semialogeneico e tratados com um antagonista de LPS apresentavam menor produção de TNF- α no soro e também menores índices de mortalidade relativa a DECH, quando comparados a animais que não receberam tal antagonista. Neste mesmo trabalho também foi observado que este tratamento não afetava o efeito enxerto versus leucemia, indicando que a ativação da imunidade inata está associada apenas com a DECH.

Entretanto, dados obtidos em modelo de indução de DECH após TCTH singeneico mostraram que camundongos hiporesponsivos a LPS desenvolvem DECH em níveis semelhantes aos de animais controles. Quando camundongos C3H/HeJ eram irradiados e recebiam medula óssea de doadores também C3H/HeJ, seguida de tratamento com um imunossupressor (ciclosporina A), estes animais desenvolviam DECH em proporções semelhantes aos seus controles (camundongos C3H/HeN, que respondem normalmente a LPS). Neste caso, a doença também se mostrou dependente da produção de TNF- α em ambos os grupos experimentais, uma vez que a neutralização do mesmo após o TCTH inibia consideravelmente a DECH. O mesmo ocorreu com a IL-12, que de forma semelhante ao TNF- α , se mostrou importante para o surgimento da DECH nos camundongos que não respondiam a LPS (Flanagan *et al.*, 2001). Este trabalho, no entanto, não examina que outras moléculas poderiam ser responsáveis pela ativação observada no sistema.

O volume de literatura disponível sobre outros TLRs em modelo experimental é inferior ao que se observa para TLR4. Apenas 3 trabalhos em

modelo experimental estão disponíveis, estudando os receptores TLR7/8 e TLR9 (Calcaterra *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008; Jaspersen *et al.*, 2009). O agonista de TLR7/8 3M-011 pode ter efeitos diferentes na DECH dependendo do momento de sua administração. Num modelo de TCTH alogeneico, a infusão de 3M-011 após o TCTH resultou numa mortalidade de 50% contra 0% do grupo controle (Taylor *et al.*, 2008). Entretanto, o pré-tratamento do receptor com o mesmo 3M-011 atrasou a mortalidade e o dano aos órgãos alvo de maneira significativa.

Receptores deficientes na molécula TLR9 apresentaram reduzida DECH sistêmica e menor mortalidade quando comparados a animais selvagens (Calcaterra *et al.*, 2008). Experimentos executados em quimeras de MO mostraram que a ausência de TLR9 no compartimento não hematopoético era responsável por este fenômeno, enquanto que a presença ou ausência de TLR9 no sistema hematopoético não tinha efeito sobre a DECH (Calcaterra *et al.*, 2008). A administração de agonista de TLR9 no momento do TCTH também aumenta a severidade da DECH através da ativação de células apresentadoras de antígeno do receptor (Taylor *et al.*, 2008).

Em humanos, polimorfismos na porção extracelular de TLR4, associados a uma resposta atenuada ao LPS inalado, foram estudados na DECH. Observou-se uma tendência a menor incidência de DECH severa, porém esta tendência não atingiu relevância estatística (Lorenz *et al.*, 2001). Em outro estudo, uma análise univariada indicou que a ocorrência de um destes polimorfismos em doador ou receptor predizia uma DECH significativamente mais severa. Esta significância estatística se perdia, porém, numa análise multivariada, indicando que o papel deste polimorfismo pode ser discreto (Elmaagacli *et al.*, 2006). Para polimorfismos de TLR9 não se observou na incidência ou severidade da DECH (Elmaagacli, Koldehoff & Beelen, 2009).

1.5. Receptores NOD na DECH

A associação dos receptores NOD com a DECH veio através de analogias feitas com a doença de Crohn. A doença de Crohn é caracterizada por inflamação

crônica do trato gastrointestinal, com produção de citocinas inflamatórias, dentre elas o TNF- α e a IL-12. Cerca de 25% dos casos de doença de Crohn estão associados com mutações no receptor NOD2 (Lesage *et al.*, 2002). Devido a semelhanças entre as sintomáticas da doença de Crohn e da DECH um estudo analisou retroativamente 169 TCTH quanto à presença das mesmas mutações responsáveis por causar doença de Crohn em doadores, receptores ou em ambos. O impacto das mutações de NOD2 foi mais proeminente em transplantes aparentados, mas também observado em não aparentados. Estas mutações se mostraram fatores de risco independentes para mortalidade relativa ao transplante, com este índice atingindo 83% em transplantes onde doador e receptor apresentavam mutação, contra 20% em indivíduos selvagens e a incidência das formas mais severas de DECH se mostrou significativamente elevada, passando de 19% nos grupos controles para 44% quando doador e/ou receptor apresentavam alguma destas mutações (Holler *et al.*, 2004). Estes resultados foram posteriormente confirmados pelo mesmo grupo num estudo multicêntrico (Holler *et al.*, 2006). Ainda em linha com estes achados, um estudo analisando transplantes alogeneicos depletados de células T chegou a resultados semelhantes, onde a DECH era potencializada quando da ocorrência dos mesmos polimorfismos observados na doença de Crohn e este efeito era mais marcante quando estes ocorriam tanto no doador quanto no receptor (Van Der Velden *et al.*, 2009).

Elmaagacli e colaboradores, em 2006, também acharam uma maior incidência de DECH em transplantes alogeneicos quando os polimorfismos de NOD2 estavam no receptor do transplante. Entretanto, um efeito oposto foi observado se o polimorfismo estivesse no doador de MO, havendo uma proteção da DECH. Uma redução significativa na incidência de DECH aguda, assim como de formas severas de DECH (graus 3 e 4) e DECH intestinal foi observada para pacientes sem polimorfismos que recebiam MO de doadores polimórficos para NOD2. Quando comparados ao grupo de pacientes que não apresentava polimorfismo no par doador-receptor, polimorfismos presentes no doador garantiam uma ocorrência de 50% de DECH aguda, 0% de DECH severa e 2% de

DECH intestinal, contra 65%, 17% e 26% de ocorrência no grupo controle sem polimorfismos (Elmaagacli *et al.*, 2006).

Além dos estudos mencionados acima, outros quatro trabalhos analisaram doadores e receptores de TCTH sem encontrar influência dos polimorfismos de NOD2 no que diz respeito ao prognóstico de DECH (Granell *et al.*, 2006; Mayor *et al.*, 2007; Sairafi *et al.*, 2008; Gruhn *et al.*, 2009).

O fato de se observarem efeitos tão opostos torna difícil hipotetizar sobre os efeitos que estes polimorfismos causam nas células que os possuem. Investigando a aparente contradição entre uma mutação que inativa o NOD2 com o surgimento de doença de Crohn, caracterizada por inflamação exacerbada, grupos distintos sugerem papéis opostos para a molécula NOD2. Watanabe e colaboradores, em 2004, descreveram que a ausência de NOD2, ou mutações desta molécula relacionadas com doença de Crohn aumentavam a resposta de TLR2. A ativação de TLR2 nestes sistemas geravam maior ativação de NFkB e conseqüentemente maior produção de citocinas inflamatórias tipicamente presentes em respostas Th1. Neste caso NOD2 teria um papel inibitório sobre a ativação de TLR2, diminuindo a resposta inflamatória gerada após ativação do sistema imune com PG (Watanabe *et al.*, 2004). Entretanto, Maeda e colaboradores descreveram, em 2005, que células de camundongos geneticamente modificados para expressarem o receptor NOD2 mutado de forma análoga a uma das mutações mais presentes em casos de doença de Crohn humana, apresentam maior ativação de NFkB e maior produção de IL-1b que animais selvagens. Neste caso, a mutação de NOD2 acarretaria numa maior capacidade de ativação deste receptor frente ao seu ligante específico (Maeda *et al.*, 2005).

1.6. O efeito probiótico na DECH e a homeostase intestinal ligada a resposta inata

A relação estabelecida entre a flora bacteriana residente no intestino e o hospedeiro recebe maior importância no caso de doenças inflamatórias do

intestino. A introdução de probiótico na dieta de animais submetidos a TCTH alogeneico atingiu resultados semelhantes à administração de antibiótico no período pós-transplante. Além disso, os animais que receberam o probiótico apresentavam menor translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos e menor produção de IFN- γ , quando comparados com animais controles (Gerbitz *et al.*, 2004).

A interação da imunidade inata com microrganismos probiótico foi abordada por Foligne e colaboradores em 2007. Em modelo de indução de colite, a transferência de células dendríticas ativadas *in vitro* com estirpes probióticas de bactérias resultava em proteção, quando comparada ao grupo controle. Esta proteção se mostrou dependente de TLR2 e de NOD2 e da geração de células T CD4⁺CD25⁺, o que não acontecia nos grupos controles onde as células dendríticas eram estimuladas com uma cepa de *E. coli* não probiótica, sugerindo assim uma ativação diferencial do sistema imune por parte destas bactérias (Foligne *et al.*, 2007).

Além disso, as interações da flora bacteriana com os receptores da imunidade inata já foram descritas como importantes para a homeostase intestinal. Rakoff-Nahoum e colaboradores descreveram num artigo de 2004 que uma relação inusitada entre a flora bacteriana e os receptores TLRs, normalmente associados à resposta a patógenos. O racional do trabalho parte do ponto que as bactérias comensais do trato digestivo também possuem PAMPs, mas não se observa ativação inflamatória neste sítio. As explicações para isto eram especulativas e sugeriam que as bactérias intestinais eram mantidas fora de contato com as células do sistema imune. No entanto, este trabalho indica que bactérias comensais são reconhecidas por TLRs em condições fisiológicas e que esta interação promove a homeostase do epitélio intestinal. Além disso, a interação da flora com os receptores TLRs protege contra a mortalidade num modelo de colite induzida artificialmente (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Outra evidência semelhante indica que o receptor NOD2 é importante para a homeostase das placas de peyer em camundongos. Camundongos deficientes em NOD2 apresentam maior número de placas de peyer quando comparados a

animais selvagens. Estas diferenças são observadas na idade adulta dos animais, já que nenhuma diferença é observada no momento do nascimento. As placas de peyer de animais deficientes em NOD2 também apresentavam maior tamanho e produção de TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-4, enquanto que nenhuma diferença foi observada no baço destes animais. Estes animais também apresentavam maior translocação bacteriana e eram mais susceptíveis a colite induzida artificialmente (Barreau *et al.*, 2007).

Estes fatos reforçam a importância do estudo das interações do sistema imune com a flora bacteriana contida no intestino, como forma de compreender como estas interações podem ser manipuladas para prevenir ou tratar doenças inflamatórias do intestino, assim como a DECH.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é determinar o papel dos receptores NOD2 em modelo experimental de DECH. Para isso os objetivos específicos são:

- Verificar se animais deficientes em NOD2 utilizados como receptores num TCTH alogeneico apresentam diferenças nos índices de DECH.
- Verificar se animais selvagens apresentam diferenças nos índices de DECH quando submetidos a TCTH alogeneico de doadores deficientes em NOD2.
- Identificar diferenças no perfil de produção de citocinas nos casos descritos acima.
- Identificar o tipo celular responsável por diferenças que venham a ser observadas nos TCTH que utilizam camundongos NOD2^{-/-}.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 (B6, H-2b), BALB/c (BALB, H-2d), F1 (B6 x BALB; F1, H-2 bxd) e NOD2^{-/-} (NOD2^{-/-}, animais que possuem o gene para NOD2 interrompido, em fundo genético de C57BL/6, H-2b) machos ou fêmeas, de 8 a 12 semanas de idade, fornecidos pelo biotério do Instituto Nacional de Câncer. Os animais foram usados de acordo com as normas institucionais de experimentação animal.

3.2. Tampão fosfato (PBS – do inglês *phosphate buffered saline*)

O PBS consiste em 0,2g cloreto de potássio (Merck – Darmstadt, HE, Alemanha), 8g cloreto de sódio (Vetec – Duque de Caxias, RJ, Brasil), 0,2g fosfato de potássio monobásico (Reagen – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 1,15g fosfato de sódio monobásico (Vetec – Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 1L de água MilliQ.

3.3. Meios de Cultura

Os meios de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – LGC Biotecnologia, Brasil) e Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) foram utilizados neste trabalho e foram suplementados com 3,7g/L bicarbonato de sódio (Vetec – Duque de Caxias, RJ, Brasil), 1mM piruvato de sódio (Invitrogen – China), 0,1mM vitaminas (Invitrogen – Nova Zelândia), 0,1mM aminoácidos não-essenciais (Invitrogen – Nova Zelândia), 0,1mM aminoácidos essenciais (Invitrogen – Nova Zelândia), 10⁵U penicilina (Sigma Chemical - Alemanha), 100mg/L estreptomomicina (Sigma Chemical – EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen – Brasil) e 1% de L-glutamina (Invitrogen – Nova Zelândia). O meio

DMEM foi utilizado em todos os experimentos, exceto para a geração de células dendríticas de medula óssea, onde foi utilizado o meio IMDM.

3.4. Contagem de células

Todas as contagens de células foram realizadas em câmara de Neubauer (Boeco Germany) e microscópio TMS-F (Nikon), excluindo-se células mortas com a utilização de 0,2% azul de Trypan (Merck - Alemanha).

3.5. Medula Óssea

Em ambiente estéril os camundongos eutanasiados tiveram suas patas traseiras retiradas e descarnadas com ajuda de bisturis (Embramed - Brasil), pinças curvas e tesouras cirúrgicas, sem a lesão prévia de osso algum, possibilitando assim o isolamento de suas tíbias e fêmures. Estes tiveram suas epífises cortadas com tesoura cirúrgica e então seus canais medulares foram lavados com um fluxo de DMEM completo aplicado com seringas de 20mL (BD Plastipak – Brasil) e agulhas descartáveis parede fina trifacetado de 26,5G para tíbias e 22G para fêmures (BD PrecisionGlide – Brasil). A medula foi recolhida em tubos estéreis de polipropileno (Greiner Bio-one – Brasil).

3.6. Baço

Em ambiente estéril, os camundongos eutanasiados tiveram seus baços retirados através de uma incisão no flanco dorsal esquerdo. Os baços foram macerados em DEMEM completo com uma trama de fibra sintética estéril e suas células, livres da cápsula foram coletadas em tubos estéreis de polipropileno.

3.7. Linfonodos

Em ambiente estéril os camundongos eutanasiados tiveram seus linfonodos poplíteos, inguinais, axilares, braquiais, mandibulares, mesentéricos e paraórticos retirados com ajuda de pinças. Os linfonodos foram macerados em DMEM completo com uma trama de algodão estéril e suas células, livres da cápsula foram coletadas em tubos estéreis de polipropileno

3.8. Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos B6 receberam 3 mL de tioglicolato por injeção intraperitoneal. Após 3 dias estes animais foram eutanasiados e sua cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS 0,5um EDTA. Esta preparação celular foi utilizada como controle positivo de expressão de NOD2.

3.9. Purificação de linfócitos T

O macerado de linfonodos foi marcado com os anticorpos anti-CD11b, anti-CD11c e anti-B220 (ou anti I-A/I-E) em DMEM. Os linfócitos T foram purificados através de depleção negativa com DynaBeads anti-IgG de rato (Invitrogen Dynal AS – Oslo, Noruega) de acordo com as especificações técnicas do produto. Os magnetos concentradores de partículas utilizados foram Dynal MPC-15 (DynaL Biotech ASA – Oslo, Noruega) para tubos de polipropileno de 15mL e Dynal MPC-S (Invitrogen Dynal AS – Oslo, Noruega) para tubos do tipo eppendorf de 1,5mL.

3.10. Depleção de células T por complemento

A depleção de células T de suspensão de células de MO foi realizada utilizando-se sobrenadantes de hibridomas GK1.5 (rico em anticorpo anti-CD4) e

53-6.7 (rico em anticorpo anti-CD8). A suspensão celular foi centrifugada a 450G por 5 minutos, o sobrenadante descartado, o pellet ressuspensão a 10^8 células/mL em solução contendo 20% de Complemento de Coelho (soro de coelho, colhido no gelo e absorvido em células de baço de camundongo – 10 mL de soro / baço – por 1 hora a 37°C), 40% de sobrenadante de GK1.5 e 40% de sobrenadante de 53-6.7. Esta suspensão foi incubada a 37°C por 30 minutos, e em seguida centrifugada a 450G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio sem SFB contendo 20% de Complemento de Coelho, sendo incubadas novamente a 37°C por 30 minutos. Por fim a suspensão celular foi centrifugada a 450 g por 5 minutos e as células ressuspensas em meio com 10% de SFB. A eficiência da depleção foi verificada por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD3 (eBioscience, CA, EUA).

3.11. Extração de RNA

O isolamento do RNA total dos linfócitos T purificados e dos macrófagos peritoneais foi realizado pelo método de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Partindo de uma suspensão de aproximadamente $2 \cdot 10^6$ células, adicionou-se 1 mL de Trizol. Esta solução foi homogeneizada e então incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Durante esta fase as amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Em seguida adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 1120 g a 4°C . Após esta centrifugação ocorre a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de trizol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi homogeneizado por inversão, seguido de incubação por 1 hora a -20°C e então centrifugado novamente a 1120 g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido e o “pellet” de RNA lavado com etanol 75% diluído em água DEPC

(Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) seguido de centrifugação a 640 g por 5 minutos a 4°C. O RNA assim obtido foi deixado secar por 5 minutos para evaporação do etanol e então ressuspenso em 10-20µL de água DEPC. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição.

3.12. Quantificação do RNA

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura no naNODrop (NaNODrop ND-1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. O material apresentou estas leituras com valores entre 1,6 a 1,8, o que caracteriza uma boa extração.

3.13. Tratamento com DNase

O RNA, já quantificado, foi tratado com DNase para evitar uma possível contaminação do RNA com DNA genômico. Para esse protocolo foi utilizado 1µl de DNase (1U/µl) para 1µg de RNA, 1µl do tampão 10x da enzima e água DEPC q.s.p. 10 µL. Essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, seguida da adição de 1µl de EDTA 25mM. Essa solução foi colocada a 65°C por 10 minutos, para que pudesse ocorrer a inativação da enzima.

3.14. Transcrição reversa

A solução final obtida pós-tratamento com DNase (1µg de RNA total) foi utilizada diretamente para síntese de cDNA (transcrição reversa). Para isso, foi adicionado 1µL de oligo(dT) (Invitrogen) (0,2 µg/µL) e 1µL de dNTP 10mM (25mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), seguido de aquecimento a 65°C em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems) por 5 minutos para remoção de estruturas secundárias, sendo colocado rapidamente no gelo ao término dessa etapa. Em seguida foi adicionado 4µL de tampão de transcrição 5x, 2µL de DTT

0,1M e por ultimo, 1µL (200U) da enzima transcriptase reversa (SuperScriptII - invitrogen). Esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 55 minutos e 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima. Como controle negativo, foi realizada toda síntese de cDNA na ausência da transcriptase reversa, dessa forma excluímos a possibilidade de amplificação por contaminação com DNA genômico. O cDNA obtido foi quantificado no naNODrop (NaNODrop ND-1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm.

3.15. Amplificação da região correspondente a NOD2 e TLR2

Para esta reação foi utilizado 1 µL do cDNA transcrito, tampão para PCR 10x (200 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1µL de dNTP 10mM (25mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 µM de cada primer (NOD2- Fwd: 5'-CAGTCATACCTTTGAACTGTATGGG-3', Rev: 5'-GGCAGTGGAGCTGGTAGTTC CC-3'; TLR2- Fwd: 5'-TGC TTT CCT GCT GGA GAT TT-3', Rev: 5'-TGT AAC GCA ACA GCT TCA GG-3'), 1,5U de Taq polimerase e água qsp 50µL. Esta reação foi processada em termociclador, sendo iniciada a 94°C por 2 minutos para desnaturação, seguido por 30 ciclos que compreendem: 94°C por 30 segundos, seguidos de anelamento a 53°C por 30 segundos e uma extensão a 72°C por 60 segundos, completados por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto desta reação foi carregado em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) e submetido a corrida eletroforética a 100 V durante 20 minutos.

3.16. Reação mista linfocitária

As reações mistas linfocitárias foram compostas em 2 diferentes protocolos. No primeiro, as células usadas como estimuladoras foram extraídas de baço. De acordo com o experimento, esta preparação foi, ou não, depletada de células CD4 e CD8 positivas, foram irradiadas a 25 Gy, para impedir a proliferação e cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $4 \cdot 10^5$ células/poço. As células usadas como respondedoras foram preparações de linfonodos totais ou células CD4 e

CD8 purificadas a partir de linfonodos, também na concentração de 4.10^5 células/poço. Para o segundo protocolo, foram usadas células BMDCs como estimuladoras (2.10^5 /poço) e linfócitos T purificados a partir de linfonodo como respondedoras (4.10^5 /poço). O volume final das culturas foi de 200 μ l e estas foram preparadas em DMEM completo. Os controles positivos consistiram de células respondedoras ativadas com concanavalina A (2,5 μ g/mL) e os controles negativos foram células respondedoras sem qualquer estímulo. As combinações de estimuladoras X respondedoras foram sempre díspares em relação ao MHC, ou seja, quando as estimuladoras foram provenientes de BALB, as respondedoras foram de B6 ou NOD2^{-/-}. Quando as estimuladoras foram de B6 ou NOD2^{-/-} as respondedoras foram provenientes de BALB.

3.17. TCTH e indução de DECH

Os camundongos receptores, com idade de 12-14 semanas, foram submetidos a um regime de condicionamento radioterápico em aparelho TH780C (Theratronics, Canada), que utiliza fonte irradiadora de cobalto 60 (⁶⁰Co), em dose única, aplicada metade em campo superior (dorso) e metade em campo inferior (abdômen). Durante a irradiação os animais foram contidos em caixas de acrílico apropriadas. A dose utilizada para receptores B6 foi de 1100 cGy e para receptores F1 de 950 cGy. Posteriormente, em ambiente estéril, foram infundidas células da medula óssea como fonte de precursores hematopoéticos e baço total ou linfócitos T purificados como fonte de células T. O número de cada tipo celular infundido foi o mesmo para todos os experimentos, sendo de 5.10^6 células de MO total e de 5.10^6 linfócitos T CD3⁺. Para tanto, quando a fonte de células T foi baço total, este teve o número de células a ser injetado corrigido a partir do percentual de células CD3⁺ presente na preparação, o que variou de 20% a 25%. Os doadores utilizados tinham idade de 8-10 semanas, foram sempre animais BALB para receptores B6 ou NOD2^{-/-} e B6 para receptores F1. As infusões foram feitas através do plexo orbital ou da veia caudal com a utilização de seringas de 1mL

(BD Plastipak – Brasil) e agulhas descartáveis parede fina trifacetado de 26,5G (BD PrecisionGlide – Brasil).

3.18. Avaliação clínica da DECHa

A DECHa experimental foi avaliada por 3 parâmetros: mortalidade, escore clínico e escore histopatológico. A mortalidade foi avaliada através da mortalidade, propriamente dita, dos camundongos ao longo do tempo pós-transplante. O escore clínico foi modificado a partir da literatura e teve 4 subdivisões: peso, pêlo, atividade e postura (Brok *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1996). Cada parâmetro recebeu um valor de 0 a 2, sendo o 0 utilizado quando o parâmetro esteve normal, 1 quando existiu alteração moderada e 2 quando a alteração foi severa. O escore clínico total foi obtido através do somatório dos escores de cada parâmetro, podendo assim variar de 0 a 8.

Tabela 1 – Especificações de escore clínico

Peso	0	Possui mais de 90% do peso do dia pré-transplante
	1	Possui entre 90 e 75% do peso do dia pré-transplante
	2	Possui menos de 75% do peso do dia pré-transplante
Pêlo	0	Íntegro
	1	Irregularidades e/ou eriçamento do pêlo
	2	Alopecia, eritema e/ou lesões na pele
Atividade	0	Íntegra
	1	Redução na movimentação
	2	Movimenta-se apenas quando estimulado
Postura	0	Normal
	1	Parcialmente curvada ou curvada apenas em repouso
	2	Prostrado

3.19. Avaliação histopatológica da DECHa

Depois do animal ser eutanasiado, foi retirada uma porção de pele do ventre de cerca de 1cm²; 1 pedaço do início do cólon ascendente (cerca de 1cm onde o mesmo foi aberto com uma tesoura e teve seu interior lavado) e um lobo do fígado. Todas as peças foram colocadas sobre um pedaço de papel dentro de um cassete e fixados em 10% Formol em PBS a temperatura ambiente durante a noite. Os cassetes foram submetidos à parafinização, corte e a coloração (hematoxina e eosina).

Cada órgão possui parâmetros individuais que receberam um valor atribuído de 0 a 2, sendo o 0 utilizado quando o parâmetro esteve normal, 1 quando existiram alterações moderadas e 2 quando as alterações foram severas (Ferrara *et al.*, 1986; Hill *et al.*, 1998; Van Den Brink *et al.*, 2000; Welniak *et al.*, 2000). O escore total de cada órgão foi então obtido através do somatório dos escores de cada parâmetro, podendo assim variar de 0 a 8 para cólon e 0 a 10 para pele e fígado.

Tabela 2 – Especificações de escore histopatológico para pele

Infiltração inflamatória	
0	Ausente
1	Dispersa
2	Organizada (dermatite de interface, nódulos, folículos)
Fibrose e perda de anexos	
0	Ausente
1	Redução dos anexos córneos
2	Ausência de anexos no corte
Alterações epidermais	
0	Epiderme com espessura normal
1	Epiderme espessada sem desarranjo das camadas

2	Epiderme espessada com desarranjo e apoptose da camada basal (disceratose)
---	--

Ulceração

0	Ausente (queratina normal)
1	Redução da queratina
2	Ulcerações

Tabela 3 – Especificações de escore histopatológico para cólon ascendente

Infiltração na lâmina própria

0	Ausente ou rara
1	Presente e dispersa
2	Presente formando aglomerados (nódulos, folículos)

Infiltração de camadas profundas

0	Ausente
1	Até submucosa
2	Além da submucosa

Alterações estruturais

0	Criptas normais
1	Alongamento das criptas (epitélio hiperplásico) com apoptose e/ou figuras de mitose
2	Destruição das criptas

Extensão do dano

0	Ausente
1	Limitado a 25% da área do corte
2	Superior a 25% da área do corte

Tabela 4 – Especificações de escore histopatológico para fígado

Alterações globais do parênquima	
0	Ausentes
1	Tumefação ou esteatose focais (< 25% do corte)
2	Tumefação ou esteatose focais (> 25% do corte)
Alterações do espaço porta	
0	Normal
1	Expansão do espaço porta por infiltração sem destruição das estruturas
2	Expansão, infiltração e/ou destruição de ductos biliares e/ou vasos
Infiltração inflamatória	
0	Ausente ou rara (limitada a células dispersas próximas aos espaços vasculares)
1	Presente e dispersa no parênquima
2	Presente formando aglomerados
Sofrimento do parênquima	
0	Ausente
1	Aumento do número de células apoptóticas e/ou figuras de mitose sem haver necrose do parênquima
2	Presença de focos de necrose (áreas de coagulação e/ou microabscessos)

3.20. Geração de células dendríticas derivadas de MO

As células de MO foram cultivadas em placas de petri contendo 2.10^6 células em 10 mL de meio IMDM completo contendo 20 ng/mL de GM-CSF recombinante, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 3 dias de cultura foi adicionado mais 5 mL de meio IMDM contendo 20 ng/mL de GM-CSF. No sexto dia de cultura, 7,5 mL de meio foi cuidadosamente retirado e substituído por 7,5

mL de meio IMDM contendo 20 ng/mL de GM-CSF fresco. No oitavo dia de cultura as células não aderentes foram cuidadosamente recolhidas e estas continham entre 60-80% de células CD11c⁺ e 100% CD11b⁺. Para as culturas de células derivadas de B6 o rendimento foi de aproximadamente $1,4-2 \cdot 10^7$ células, enquanto que culturas derivadas de MO NOD2^{-/-} apresentaram rendimento aproximadamente 2 vezes maior, variando de $2-4 \cdot 10^7$ células no final da cultura.

3.21. Dosagem de citocinas por ELISA

Para a dosagem de citocinas em alguns experimentos foram utilizados os ensaios imunoenzimáticos “Duoset IC (R&D Systems – Minneapolis – MN – EUA)” para IFN- γ , IL-10 e G-CSF e para IL-17A, IL-17F e IL-23 foram utilizados Ready-Set-Go (eBioscience – San Diego – CA – EUA). O procedimento se seguiu de acordo com as instruções de cada fabricante. A leitura da placa é realizada com o Versamax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices – Califórnia – EUA) no comprimento de onda de 450nm e analisada no software SOFTmax PRO LS 4.3 (Molecular Devices) utilizando regressão logística de 4 parâmetros para a geração da equação da reta.

3.22. Dosagem de citocinas por multiplex ELISA

Os soros dos animais transplantados, os sobrenadantes de culturas de células dendríticas (em repouso ou ativadas) tiveram diversas citocinas dosadas por multiplex ELISA. Os kites foram comprados da Bio-Rad (“Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay”) e da Millipore (milliplexTM map kit, customizado com IL-2, 4, 6, 10, 12p40, 12p70 e 17A, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, RANTES e KC). As amostras de soro foram diluídas em matriz fornecida pelos fabricantes na proporção de 1:5 para o kit proveniente da BD e 1:2 para o kit Millipore. O procedimento dos testes respeitaram as recomendações dos fabricantes. As

leituras foram feitas num aparelho LabScan100 (One Lambda, California, EUA) e as análises feitas com o software XPonent 3.1 (Luminex, Texas, EUA).

4. RESULTADOS

Para estudar o papel da molécula NOD2 nos tecidos resistentes a radiação, foram utilizados animais deficientes em NOD2 como receptores num TCTH. Neste modelo a radiação elimina as células da MO, mas outros tecidos são preservados, como, por exemplo, os epitélios.

O protocolo experimental escolhido começa com a irradiação dos receptores com 1000 cGy. Os grupos experimentais foram compostos por receptores B6 (controle positivo de DECH) ou NOD2^{-/-} (grupo teste) que receberam 5.10⁶ células de MO e 5.10⁶ células T purificadas provenientes de animais BALB/c. O controle de sobrevivência foi composto por animais B6 submetidos a TCTH singeneico, ou seja, recebendo 5.10⁶ células de MO e 5.10⁶ linfócitos T advindos de animais também B6.

Foram executados 3 TCTH deste tipo, com o número de animais por grupo experimental variando de 8 a 10. Nestes experimentos, mostrados na figura 5, fica visível uma maior mortalidade no grupo NOD2^{-/-}, quando comparado ao grupo B6. Em relação aos escores clínicos, também se observa uma tendência à exacerbação da doença no grupo NOD2^{-/-}, em alguns momentos, também estatisticamente significativa (figura 5).

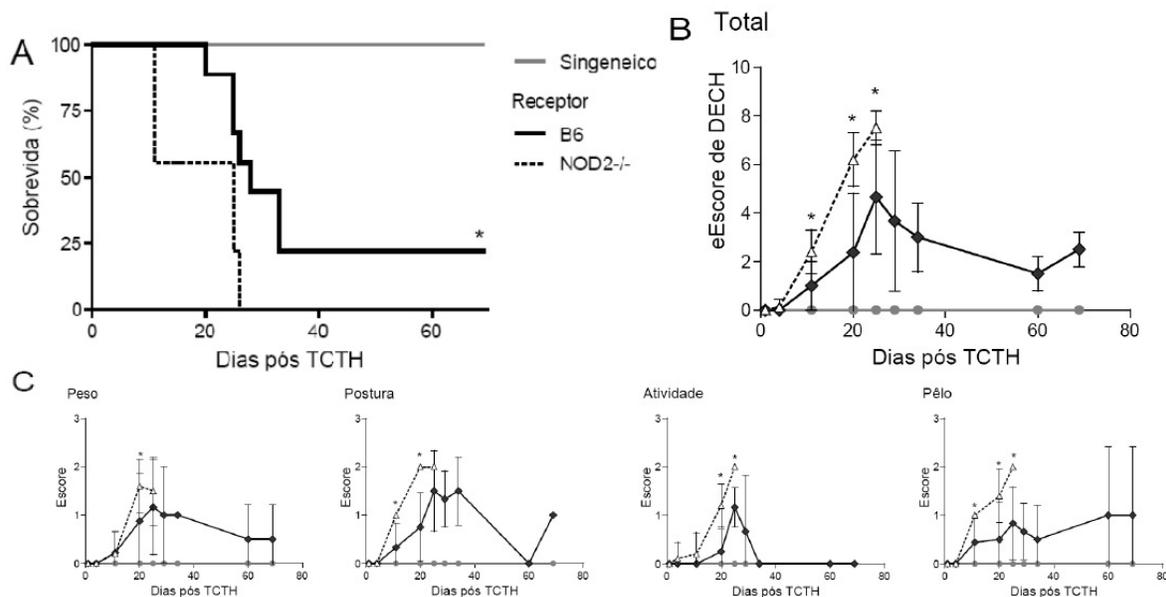


Figura 5. Ausência de NOD2 nos tecidos rádio resistentes agrava DECH: Animais B6 ou NOD2^{-/-} foram letalmente irradiados e receberam 5x10⁶ células de MO e linfócitos T purificados de doadores BALBc. O controle singeneico foram animais B6 que receberam as mesmas células de doadores B6. (A) Percentual de sobrevivência, * indica P < 0,05 para o teste de log rank entre os grupos B6 e NOD2^{-/-}. (B) Escore clínico total de DECH. (C) Escores clínicos individuais. Barras de erro representam desvio padrão, * indica P < 0,05 para two-way ANOVA e n=8 animais por grupo. Um experimento representativo de 3.

Na tentativa de mimetizar a ativação celular que acontece *in vivo* durante a DECH, foram feitas reações mistas linfocitárias. Esta série de experimentos teve o objetivo de verificar possíveis diferenças no perfil de produção de citocinas e de proliferação da resposta alogênica de células NOD2^{-/-}, quando comparadas a células normais.

No primeiro protocolo utilizado, células de baço total foram extraídas de animais BALB/c e irradiadas para servirem de estimuladoras. Estas células foram colocadas em cultura com células respondedoras, provenientes de animais B6 ou NOD2^{-/-}. Estas culturas foram então avaliadas quanto a proliferação e a produção de citocinas. Foram dosadas por ELISA IL-17 e IFN- γ e também foi feita marcação intracelular para IL-17, IFN- γ (figura 6A). A proliferação foi determinada por incorporação de timidina tritiada (figura 7). A proliferação não foi diferente entre os grupos, assim como a produção de IFN- γ , ao passo que a produção de IL-17 mostrou-se significativamente aumentada nos sobrenadantes das culturas contendo células NOD2^{-/-}. As marcações intracelulares confirmaram o resultado da

IL-17, tendo-se maior porcentagem de células positivas para esta citocina nas culturas NOD2^{-/-}, ao passo que não se constataram diferenças na frequência de células positivas para IFN- γ e as porcentagens de células positivas para IL-4 nestas culturas foram desprezíveis (figura 8A).

Curiosamente, resultados semelhantes são encontrados quando as reações mistas linfocitárias são compostas por células estimuladoras extraídas de baço total irradiado de animais NOD2^{-/-} ou animais B6 contra linfonodo total de BALB/c como respondedor. Neste caso, também se encontrou elevada a produção de IL-17 nas culturas contendo células NOD2^{-/-} quando comparadas às culturas contendo células selvagens. A proliferação, assim como os níveis de IFN- γ não se mostraram diferentes (figura 7 e 6B). Nas marcações intracelulares, mais uma vez os resultados se confirmaram. A figura 8B mostra que as frequências de células produtoras de IFN- γ são semelhantes entre os grupos experimentais, ao passo que a frequência de células positivas para IL-17 está aumentada nos grupos contendo células NOD2^{-/-}, quando comparados com os grupos contendo células selvagens.

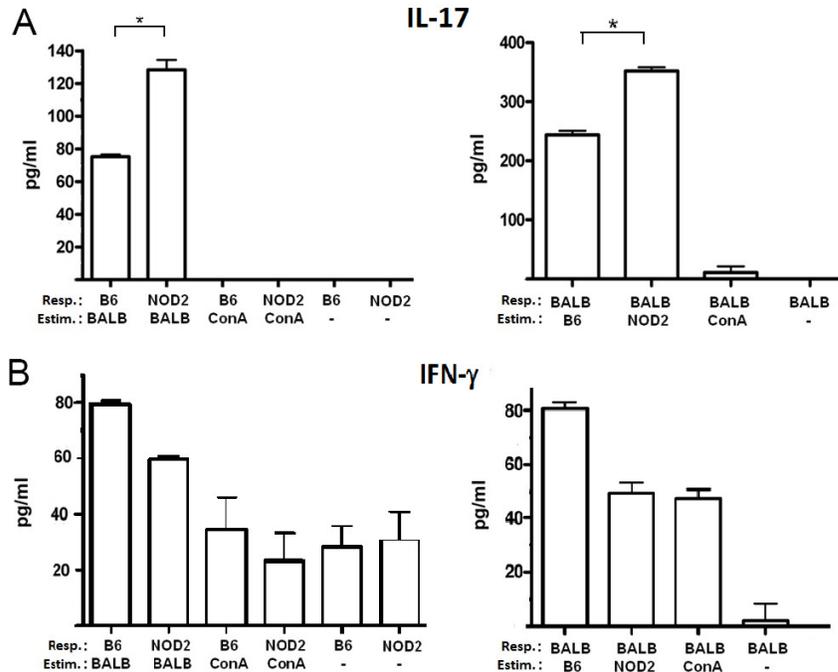


Figura 6. Maior produção de IL-17 em MLRs contendo células NOD2^{-/-}: 4.10⁵ esplenócitos irradiados a 25 Gy serviram de estimuladores para 4.10⁵ células de linfonodo total, nas combinações indicadas na figura. (A) Concentração de IL-17A medida por ELISA após 4 dias de cultura. (B) Concentração de IFN-γ medida por ELISA após 2 dias de cultura. Os controles positivos foram células respondedoras estimuladas com 2,5 μg de concanavalina A e os controles negativos foram células respondedoras sem qualquer estímulo. Barras de erro representam desvio padrão e * indica $P < 0,05$ para one-way ANOVA. Um experimento representativo de 3.

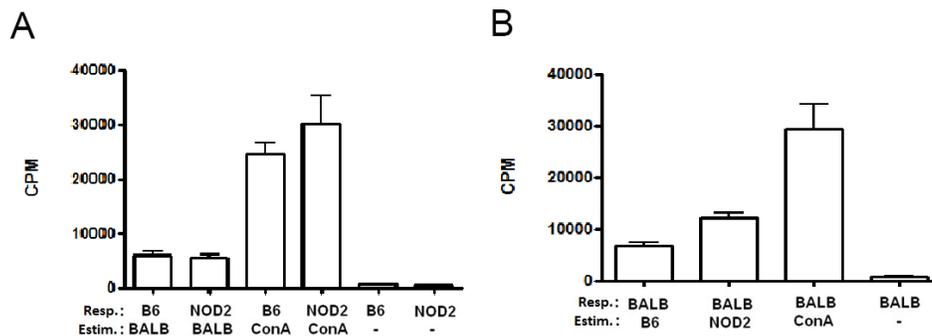


Figura 7. Proliferação não é alterada em MLRs contendo células NOD2^{-/-}: 4.10⁵ esplenócitos irradiados a 25 Gy serviram de estimuladores para 4.10⁵ células de linfonodo total, nas combinações indicadas na figura. Proliferação medida por incorporação de timidina tritiada. (A) Proliferação com células estimuladoras de BALB/c após 5 dias de cultura. (B) Proliferação com células estimuladoras B6 ou NOD2^{-/-} após 5 dias de cultura. Os controles positivos foram células respondedoras estimuladas com 2,5 μg de concanavalina A e os controles negativos foram células respondedoras sem qualquer estímulo. Barras de erro representam desvio padrão e * indica $P < 0,05$ para one-way ANOVA. Um experimento representativo de 3.

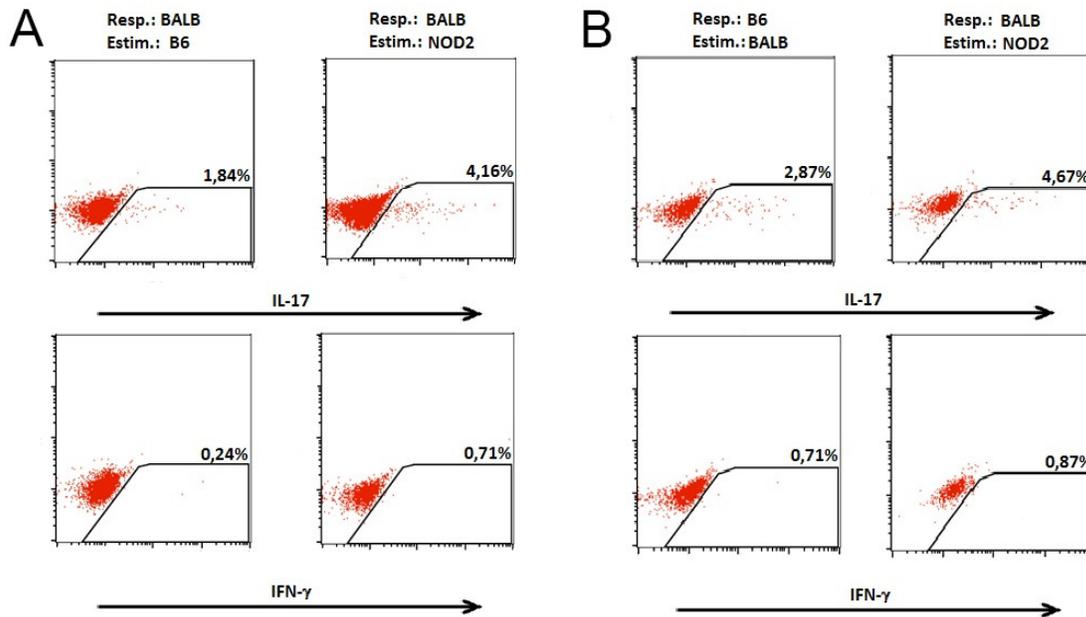


Figura 8. Maior percentual de células produtoras de IL-17 em MLRs contendo células NOD2^{-/-}: $4 \cdot 10^5$ esplenócitos irradiados a 25 Gy serviram de estimuladores para $4 \cdot 10^5$ células de linfonodo total, nas combinações indicadas na figura. (A) Percentual de células positivas para IL-17A e IFN- γ após 6 dias de cultura. (B) Percentual de células positivas para IL-17A e IFN- γ após 6 dias de cultura. Um experimento representativo de 3.

Para eliminar uma possível interferência de linfócitos T presentes na porção estimuladora da cultura e uma possível ação de células apresentadoras presentes no material extraído de linfonodos (células respondedoras), um novo protocolo foi realizado para a reação mista linfocitária. Este protocolo utilizou células dendríticas derivadas de MO como estimuladoras e as respondedoras permaneceram como linfócitos T purificados. Neste caso a produção de IL-17 se mostra aumentada após 2 dias de cultura, estando semelhante no ponto de 4 dias, diferentemente das anteriores onde a produção de IL-17 só se observa diferente com 4 dias de cultura (figura 9). Neste caso também foram dosadas diversas outras citocinas por multiplex ELISA, onde se destaca a maior produção de G-CSF nas culturas contendo células estimuladoras NOD2^{-/-}, quando comparadas as culturas de células selvagens.

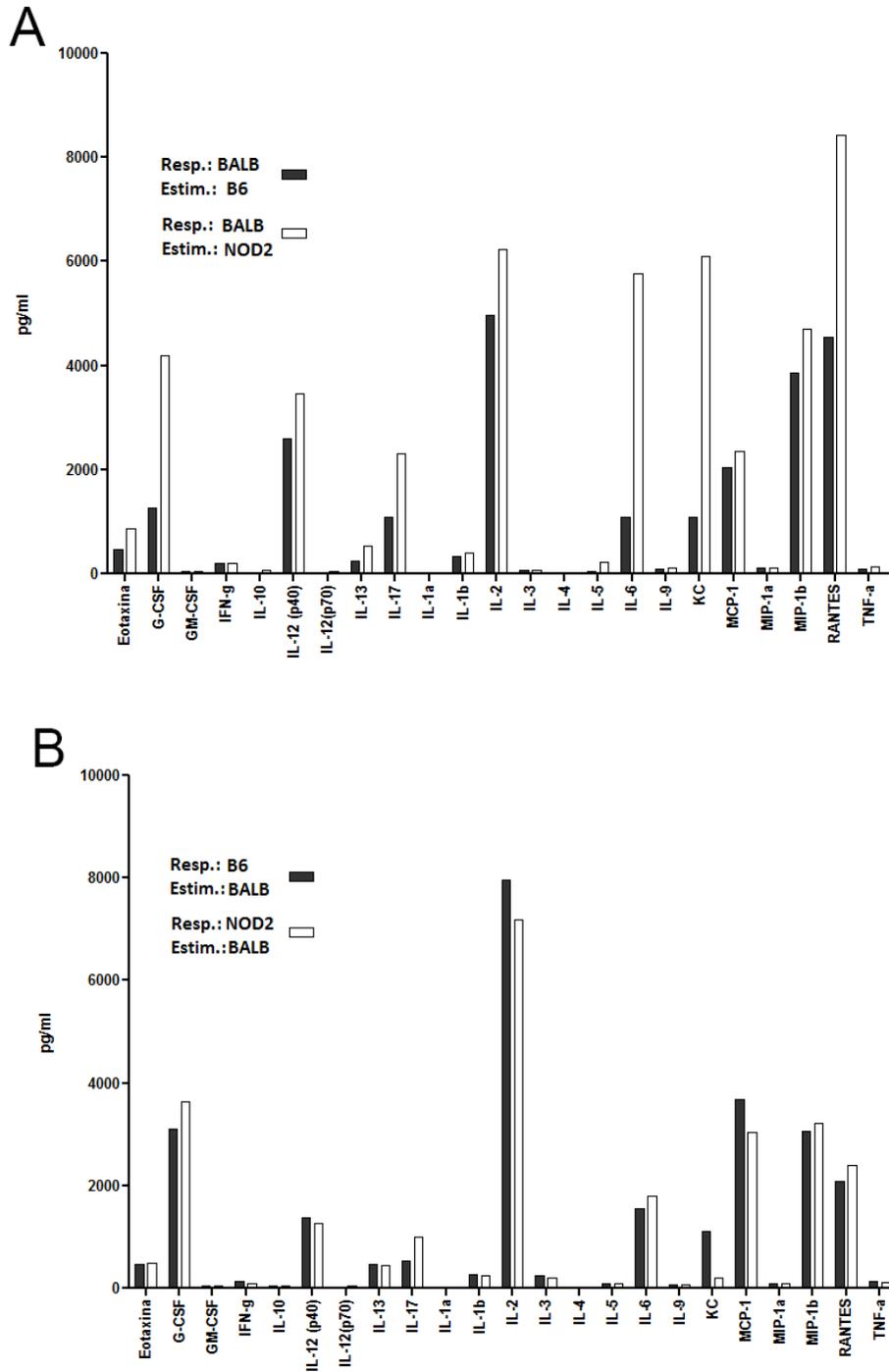


Figura 9. Produção diferencial de citocinas em MLRs contendo células $NOD2^{-/-}$: 2.10^5 BMDCs serviram de estimuladores para 4.10^5 linfócitos T purificados. (A) Multiplex ELISA para estimuladoras B6 ou $NOD2^{-/-}$ e respondedoras BALB/c após 2 dias de cultura. (B) Multiplex ELISA para estimuladoras BALB/c e respondedoras B6 ou $NOD2^{-/-}$ após 2 dias de cultura. Dados referentes a um experimento.

Como os resultados da reação mista linfocitária apontaram para um possível papel da molécula NOD2 nas células T foi investigada a possível expressão deste receptor em células T purificadas. Para tanto células T de animais B6 foram altamente purificadas por separação num citometro de fluxo moflow. Esta purificação alcançou 99,9% de pureza de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Como controle positivo foram extraídas células de lavado peritoneal elicitado com tioglicolato de animais B6. Estas células foram submetidas ao protocolo de extração de RNAm e síntese de cDNA com primers específicos para a seqüência genética do mRNA de NOD2 na junção dos exons 2 e 3, o que, quando da existência deste mRNA na preparação, resulta num fragmento de 294 pb. Como fica demonstrado na figura 10A, não existe expressão detectável de NOD2 em células T de animais B6. O controle positivo mostra a banda esperada de 294 pb. Neste experimento também se averiguou a expressão do receptor TLR2 nas mesmas células. Nossos resultados suportam dados da literatura que já haviam detectado a expressão de RNAm para TLR2 em células T (figura 10B).

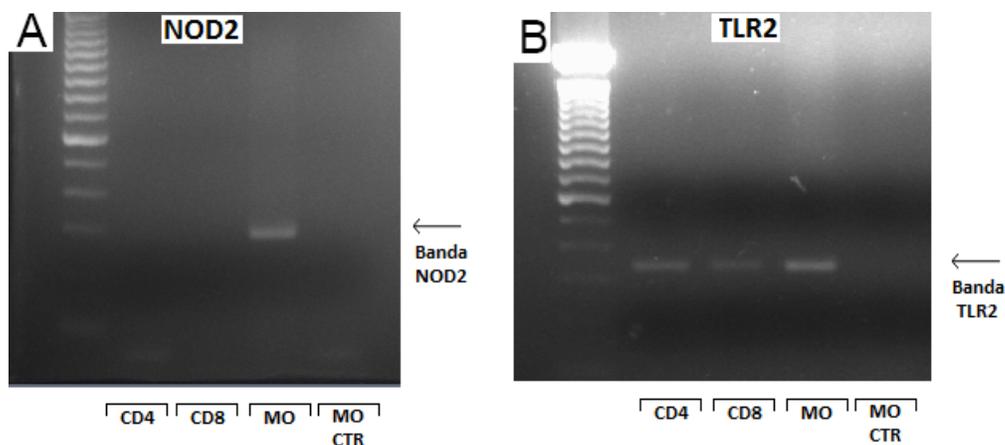


Figura 10. Expressão de NOD2 está ausente em linfócitos T CD4 e CD8: linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ altamente purificados, tiveram seu conteúdo de RNAm extraído e convertido a cDNA para verificação da expressão de NOD2 (A) ou TLR2 (B). As setas indicam a localização das bandas. O controle positivo foi material extraído de macrófagos peritoneais e o controle negativo foi o mesmo material de macrófagos peritoneais sem adição da transcriptase reversa em ambos os casos. Dados referentes a um experimento.

Para investigar o papel do receptor NOD2 no compartimento rádio sensível do TCTH foi escolhido um modelo semialogeneico. Neste caso, animais F1 (B6 X BALB/c) foram letalmente irradiados e receberam MO e baço total de animais B6 ou NOD2^{-/-}, nas combinações mostradas na figura 11. A quantidade de células de MO foi sempre de 5.10⁶, enquanto que a quantidade esplenócitos foi corrigida de acordo com a percentagem de células T neste, para que o grupo experimental recebesse 5.10⁶ linfócitos T CD3⁺. O controle de sobrevivência foi um TCTH singênico, onde os animais F1 recebem MO e esplenócitos de doadores também F1. A figura 11 mostra que os animais que receberam MO e esplenócitos de doadores NOD2^{-/-} tiveram uma sobrevivência aumentada quando comparada aos animais que receberam estas células de doadores B6. Além disso, animais que receberam MO de B6, mas receberam esplenócitos de NOD2^{-/-} também apresentaram sobrevida aumentada, assim como os animais que receberam MO de NOD2^{-/-} e esplenócitos de B6. Este resultado deixa claro um papel nocivo da molécula NOD2 neste modelo experimental.

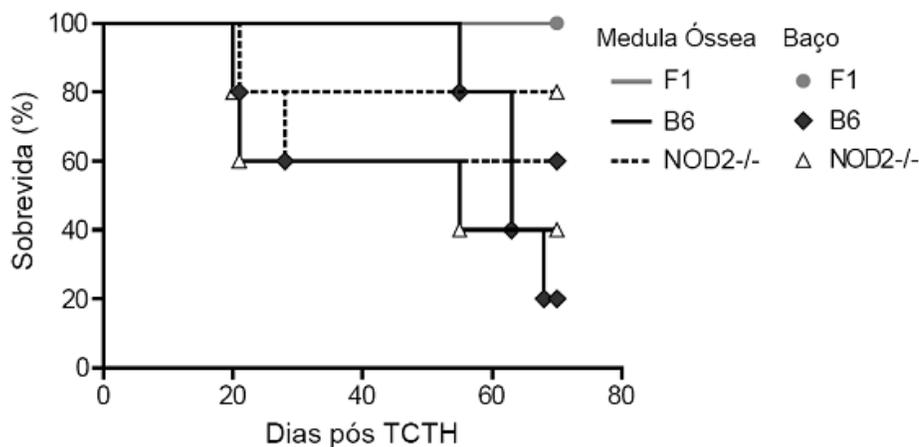


Figura 11. Células mieloides NOD2^{-/-} protegem da mortalidade por GVHD: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam 5.10⁶ células de MO e esplenócitos (corrigidos para 5.10⁶ células CD3⁺) de doadores B6 ou NOD2^{-/-} nas combinações indicadas na figura. O controle singeneico foram animais F1 que receberam as mesmas células de doadores F1. Percentual de sobrevivência, log rank: $P < 0,05$ entre NOD2^{-/-} MO+Bç. e B6 MO+Bç. ; $P < 0,05$ entre NOD2^{-/-} MO+B6 Bç. e B6 MO+Bç. ; $P > 0,05$ entre B6 MO+NOD2^{-/-} Bç. e B6 MO+Bç. Um experimento representativo de 2.

Em seguida foi dado início a uma tentativa de descobrir qual, ou quais, as células NOD2^{-/-} responsáveis pelo efeito protetor observado. Para testar se as células T seriam as responsáveis por esse efeito, realizou-se TCTHs tendo como material indutor de DECH células T purificadas a partir de linfonodos no lugar de baço total. Estas purificações foram feitas usando “Dynabeads” num protocolo de seleção negativa, ou seja, os linfonodos macerados foram marcados com anticorpos monoclonais da classe IgG derivados de hamster (anti-B220, anti-CD11b, anti-CD11c) para em seguida ser acrescentado um anticorpo secundário anti-IgG de Hamster conjugado a micro esferas de metal. O material foi então levado a um ímã que reteve as células marcadas deixando apenas as células de interesse, no caso células T, sempre com pureza superior a 95% de células CD3⁺. A figura 12 mostra que as células T NOD2^{-/-} tem a mesma capacidade de induzir DECH que as células selvagens. Neste caso os animais receptores receberam células de MO de animais B6 e receberam células T purificadas de animais B6 ou NOD2^{-/-} e estes dois grupos não mostram diferenças significativas na sobrevivência após o transplante, tendo os dois grupos apresentado mortalidades equivalentes.

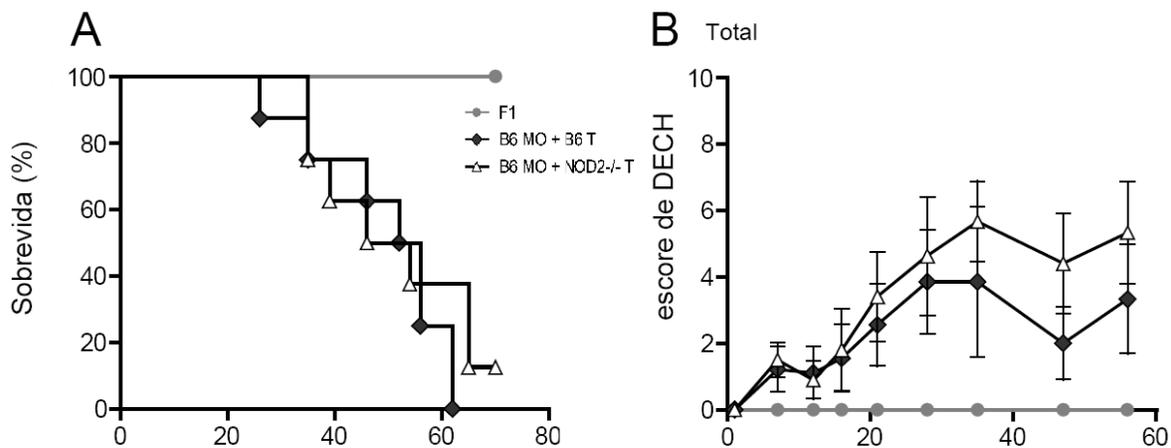


Figura 12. Linfócitos T NOD2^{-/-} não são responsáveis pela proteção da GVHD: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam 5.10⁶ células de MO de B6 e 5.10⁶ linfócitos T purificados de doadores B6 ou NOD2^{-/-}. O controle singeneico foram animais F1 que receberam as mesmas células de doadores F1. (A) Percentual de sobrevivência. (B) Escore clínico total de DECH. Barras de erro representam desvio padrão. Um experimento representativo de 2 com n=8 animais por grupo.

Para melhor caracterizar o perfil da DECH observada nos experimentos também foram observados parâmetros clínicos nos animais transplantados. Os parâmetros observados foram: atividade, aspecto do pêlo, perda de peso e postura. De acordo com a severidade das alterações observadas um escore era atribuído a cada animal, sendo 3 essas possibilidades, onde o escore 0 significa sem alteração, 1 significa alteração branda e 2 significando alterações severas em cada um desses parâmetros. Além disso, o somatório de todos os parâmetros resulta no escore total da DECH. O escore total está demonstrado na figura 12B. Como pode-se observar, não se verificou diferenças significativas entre os animais que recebem células T de B6 ou de animais deficientes em NOD2 em nenhum dos parâmetros analisados.

Após as células T NOD2^{-/-} terem sido descartadas como responsáveis pelo efeito protetor observado, a próxima população de células escolhida para ser testada foi a população de células apresentadoras de antígeno, já que no baço existe um número considerável de células com capacidade apresentadora de antígeno e os animais que receberam baço total tiveram proteção da morte por DECH. Para tanto, 2 grupos de animais F1 letalmente irradiados receberam MO e células T purificadas de animais B6, sendo que um deles recebeu também 2.10⁶ células CD11b⁺, CD11c⁺ purificadas a partir de baço de animais B6 e o outro recebeu estas células purificadas a partir de baço de animais NOD2^{-/-}. Estas populações foram obtidas através de seleção negativa em 2 protocolos diferentes. No primeiro foram utilizados dynabeads, com exclusão de células CD4, CD8 e B220, resultando num enriquecimento para 50% de células negativas para CD4, CD8 e B220 para células providas de baço de B6 e para 60% em células provenientes de animais NOD2^{-/-}. Para um segundo experimento, o método de purificação foi por colunas magnéticas MACS. Neste caso também foram excluídas as células CD49b⁺ (um marcador de células natural killer) além das células CD4, CD8 e B220 positivas. A pureza final das células negativas para estes marcadores foi de 60% para as células de baço de B6 e 80% para as de baço de animais NOD2^{-/-}. Ambos os experimentos tiveram resultados semelhantes. A figura 13A mostra a curva de sobrevivência referente ao segundo

protocolo. Como se pode observar, os grupos experimentais que receberam células purificadas a partir de baço de animais NOD2^{-/-} tiveram uma sobrevivência aumentada quando comparados a animais que receberam estas mesmas células de animais B6. Apesar da proteção observada em termos de sobrevivência, os animais sobreviventes que receberam células NOD2^{-/-} não apresentaram manifestações clínicas de DECH amenizadas, tendo os escores de doença para pele, postura, atividade, peso e total comparáveis aos escores de animais que receberam células de doadores selvagens (figura 13B).

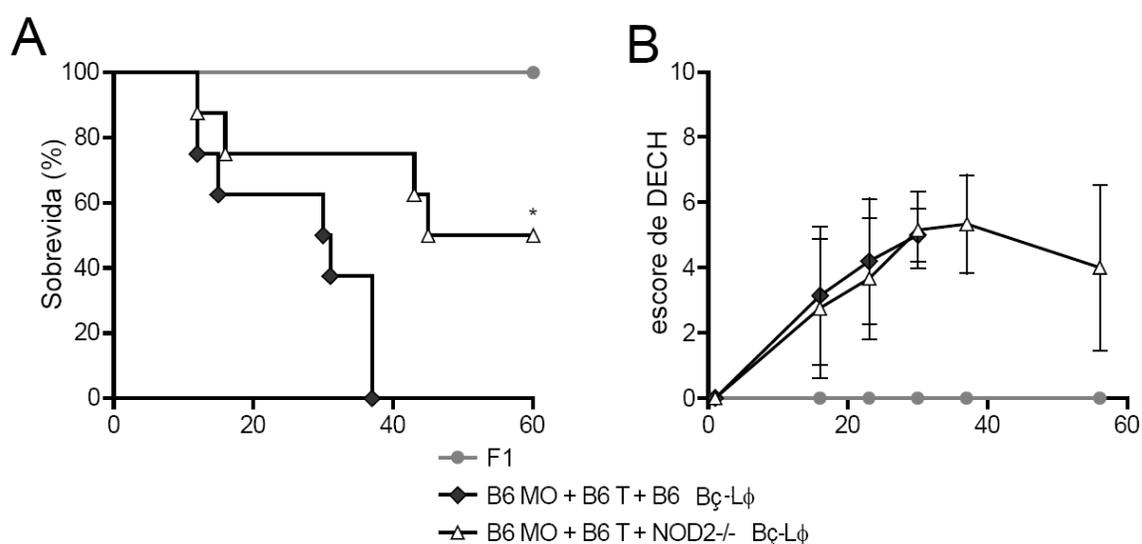


Figura 13. Células esplênicas não T, B, NK de doadores NOD2^{-/-} protegem da mortalidade na DECH: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam $5 \cdot 10^6$ células de MO e $5 \cdot 10^6$ linfócitos T purificados de doadores B6, além de esplenócitos depletados de células T, B e NK de doadores B6 ou NOD2^{-/-}. O controle singênico foram animais F1 que receberam as mesmas células de doadores F1. (A) Percentual de sobrevivência, * indica $P < 0,05$ para o teste de log rank entre os grupos B6 e NOD2^{-/-}. (B) Escore clínico total de DECH. Barras de erro representam desvio padrão. Um experimento representativo de 2 com $n=8$ animais por grupo.

Após 18 dias da indução da DECH, alguns animais foram sacrificados para que fosse realizada a análise histopatológica de fígado, pele e cólon. Para a histopatologia também foi atribuída uma gradação para determinar a gravidade das alterações observadas (ver materiais e métodos). Neste caso, também não foram observadas diferenças significativas no que tange a gravidade das

alterações do grupo teste (NOD2^{-/-}) quando comparadas ao grupo controle de mortalidade (B6) (figura 14).

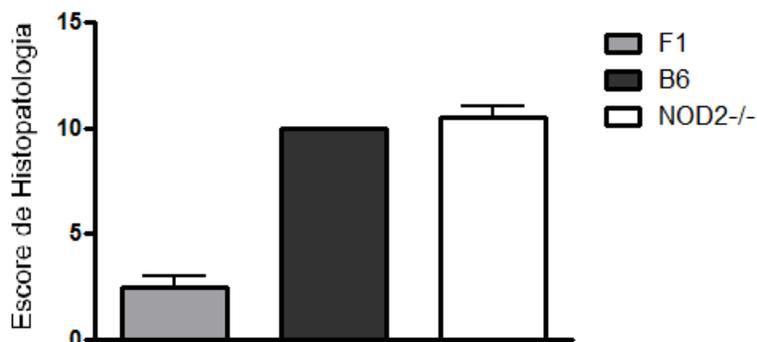


Figura 14. Escores histopatológicos não acompanham a proteção observada na sobrevivência de animais protegidos da mortalidade por GVHD: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam 5.10^6 células de MO e 5.10^6 linfócitos T purificados de doadores B6, além de esplenócitos depletados de células T, B e NK de doadores B6 ou NOD2^{-/-}. Escore histopatológico total (soma dos escores de fígado, pele e cólon). Barras de erro representam desvio padrão. Um experimento representativo de 2 com n=8 animais por grupo.

Para que fosse verificada uma possível diferença qualitativa na resposta imunológica desencadeada em cada grupo experimental, o soro destes animais teve diversas citocinas dosadas. Como pode-se observar na figura 15, os níveis de G-CSF se apresentaram robustamente aumentados no grupo que recebe células NOD2^{-/-} tanto em 6 (figura 15A) quanto em 18 (figura 15B) dias pós transplante.

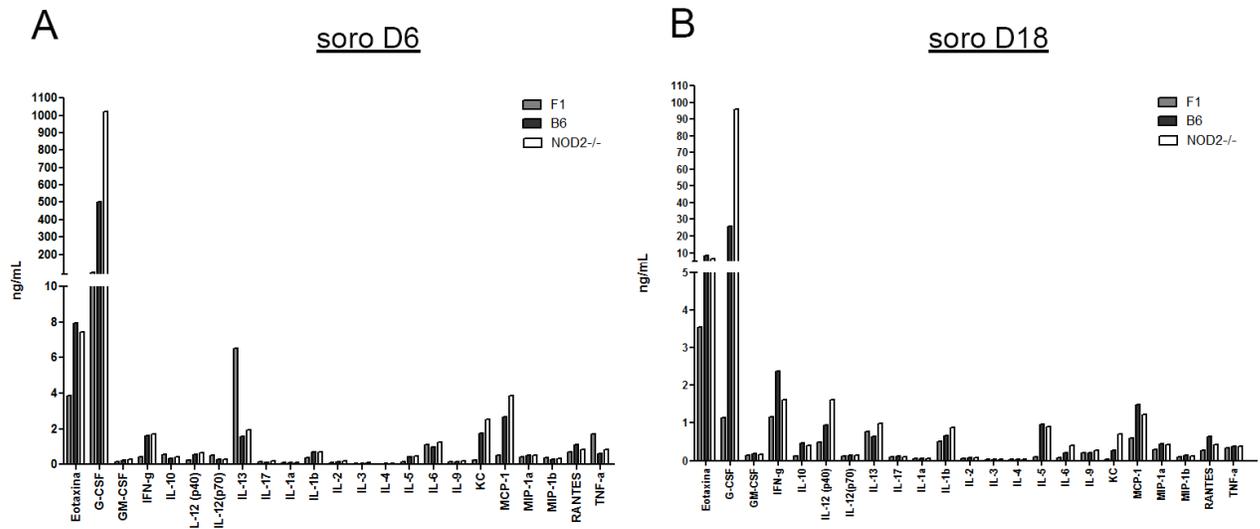


Figura 15. Perfil de citocinas no soro de camundongos pós TCTH: Soros de animais transplantados como descrito na figura 11 foram coletados após 6 (A) ou 18 (B) dias. As citocinas foram dosadas por multiplex ELISA. Dados referentes a um experimento com n=10 animais por grupo para A e 5 para B.

Em seguida foi realizada a contraprova do TCTH anterior. Para tanto foi utilizado um protocolo de purificação celular que visou eliminar a população APC fagocítica do material esplênico. Esta purificação foi feita por seleção negativa, utilizando-se dynabeads. Neste caso as células CD11b⁺ e CD11c⁺, além das células CD4⁺ e CD8⁺, foram marcadas com anticorpos conjugados a micro esferas magnéticas para que ficassem retidas na coluna. O material resultante teve uma pureza de superior a 95%, para as células derivadas tanto de B6 quanto de NOD2^{-/-}. Este material foi então utilizado num TCTH como o anterior, sendo dados a animais F1 letalmente irradiados, 5.10⁶ células de MO e linfócitos T purificadas de B6 para ambos os grupos e baço depletado de APCs derivadas de B6 para o controle de mortalidade e derivado de NOD2^{-/-} para o grupo teste. Como se pode observar na figura 16A, a depleção de células CD11c⁺ e CD11b⁺ do material esplênico, aboliu a proteção anteriormente observada, já que o grupo teste teve mortalidade semelhante ao grupo controle de mortalidade. Além disso, a severidade da DECH aferida através de parâmetros clínicos também esteve comparável entre estes dois grupos (figura 16B).

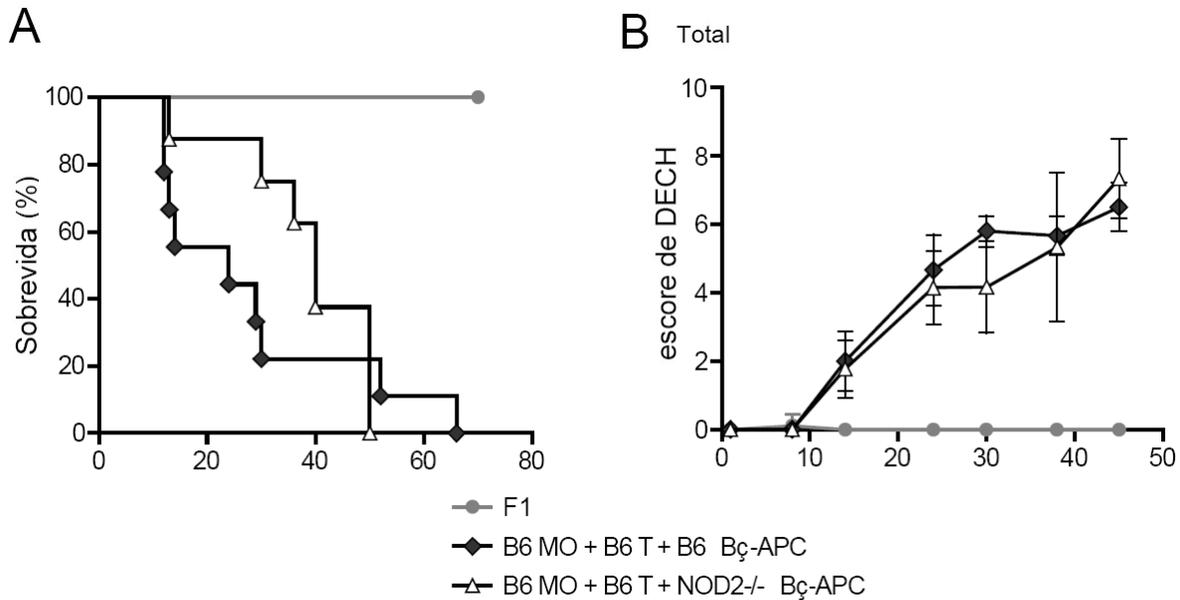


Figura 16. Células esplênicas não CD11b⁺, CD11c⁺ de doadores NOD2^{-/-} não protegem da mortalidade na DECH: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam 5.10⁶ células de MO e 5.10⁶ linfócitos T purificados de doadores B6, além de esplenócitos depletados de células CD11b⁺ e CD11c⁺ de doadores B6 ou NOD2^{-/-}. O controle singênico foram animais F1 que receberam as mesmas células de doadores F1. (A) Percentual de sobrevivência. (B) Escore clínico total de DECH. Barras de erro representam desvio padrão. Um experimento representativo de 2 com n=8 animais por grupo.

Após a confirmação que as células fagocíticas com capacidade apresentadora de antígeno derivadas de animais NOD2^{-/-} eram as responsáveis pelo efeito protetor observado, foi utilizado um novo protocolo para a obtenção de uma população mais homogênea destas células. Neste caso as células dendríticas foram escolhidas para teste, já que são as células com maior capacidade apresentadora de antígeno. Sendo assim, células dendríticas foram derivadas em cultura, a partir de MO de animais B6, NOD2^{-/-}. O cultivo das MO em meio suplementado com GM-CSF, resultou numa população 100% positiva para CD11b, com níveis de CD11c⁺ variando entre 65% e 80% e sem níveis relevantes de células CD3⁺ ou B220⁺. Estas células também apresentaram níveis de expressão de marcadores de ativação e maturação (CD80, CD86, CD83, MHC II) compatíveis com células imaturas. Um fator importante de se ressaltar é que não houve diferenças fenotípicas marcantes entre as células derivadas a partir de MO

de animais NOD2^{-/-} quando comparadas às de B6 (figura 17). O sobrenadante destas culturas foi submetido à dosagem de diversas citocinas, onde mais uma vez não se observou diferença entre as células derivadas de B6 e de NOD2^{-/-} para a maioria das citocinas, mas níveis menores de G-CSF foram encontrados em sobrenadantes de células NOD2^{-/-} (figura 17B). Entretanto, ao serem ativadas com LPS por 24h se observou uma maior produção de G-CSF pelas células NOD2^{-/-} e uma menor produção de KC (figura 17C).

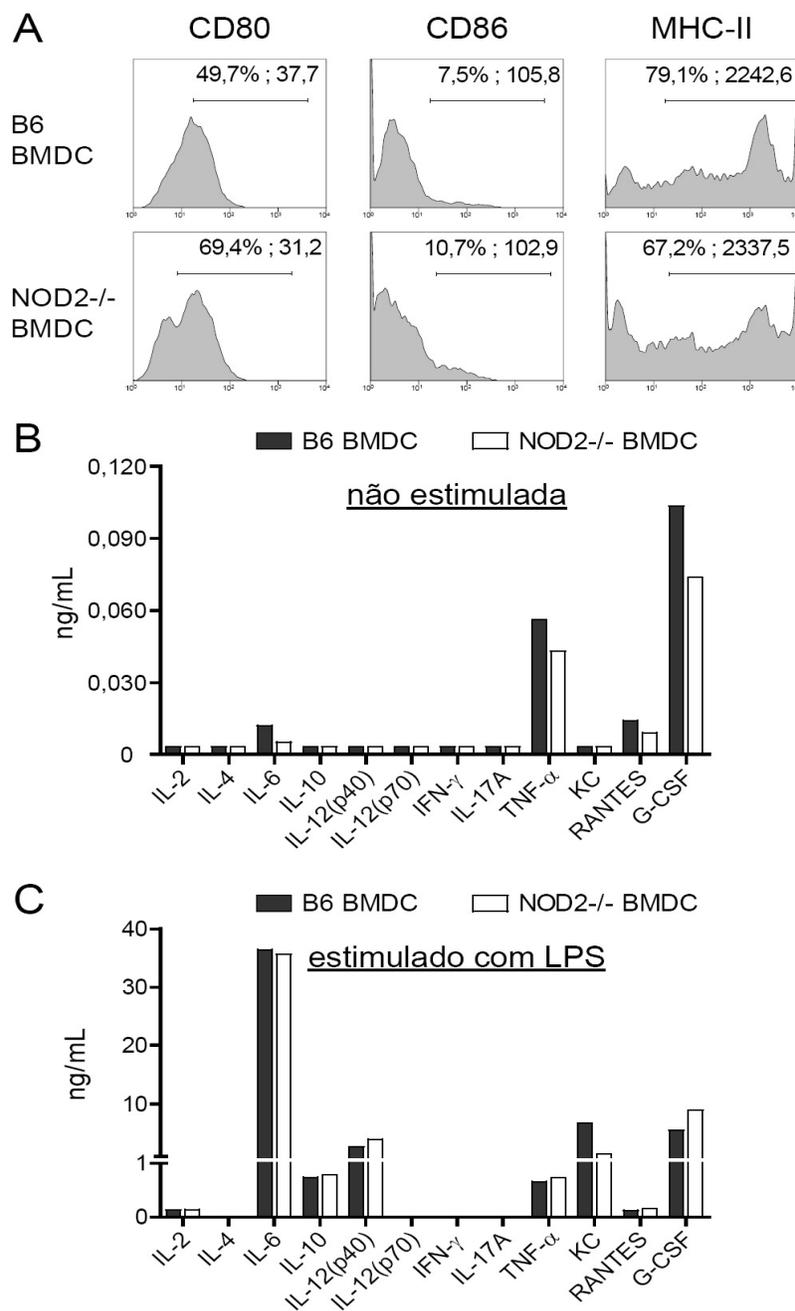


Figura 17. BMDCs derivadas de animais B6 ou NOD2^{-/-} apresentam perfil similar *in vitro*: (A) Expressão de CD80, CD86 e MHC-II em BMDC de animais B6 ou NOD2^{-/-}. Percentual e média de fluorescência (MFI) das populações positivas estão mostrados. (B) Produção de citocinas de BMDC não estimuladas ou (C) estimuladas com 1 μ g/mL de LPS. Dados de um experimento representativo de 2.

Após a caracterização das células dendríticas derivadas de MO, estas células foram utilizadas num TCTH para verificar se teriam a mesma funcionalidade de células CD11c⁺, Cd11c⁺ extraídas do baço. Seguiu-se, então, o mesmo protocolo adotado anteriormente, onde os grupos experimentais (animais F1 irradiados) receberam MO e células T purificadas de B6 e um dos grupos recebeu também células dendríticas derivadas de MO de B6 enquanto o outro grupo recebeu estas células derivadas de animais NOD2^{-/-}. A curva de mortalidade obtida com este experimento demonstrou uma sobrevivência de aproximadamente 60% dos animais que receberam células dendríticas NOD2^{-/-}, contra 0% de receptores que receberam células derivadas de B6 (figura 18A). Esta proteção se refletiu também em escores clínicos menos severos nos animais do grupo NOD2^{-/-}, quando comparados aos do grupo B6, para todos os parâmetros analisados (figura 18B). Entretanto, esta proteção observada na mortalidade e nos parâmetros clínicos não se refletiu nos escores histopatológicos, tendo o grupo NOD2^{-/-} apresentando-se muito semelhante ao grupo B6, com exceção da pele, que apresentou menos dano no grupo NOD2^{-/-}. Quando os mesmos parâmetros histopatológicos foram analisados nos animais do grupo NOD2^{-/-} 5 meses após o transplante, foi verificado que as lesões regrediram estavam praticamente em níveis normais (figura 18C, D e E).

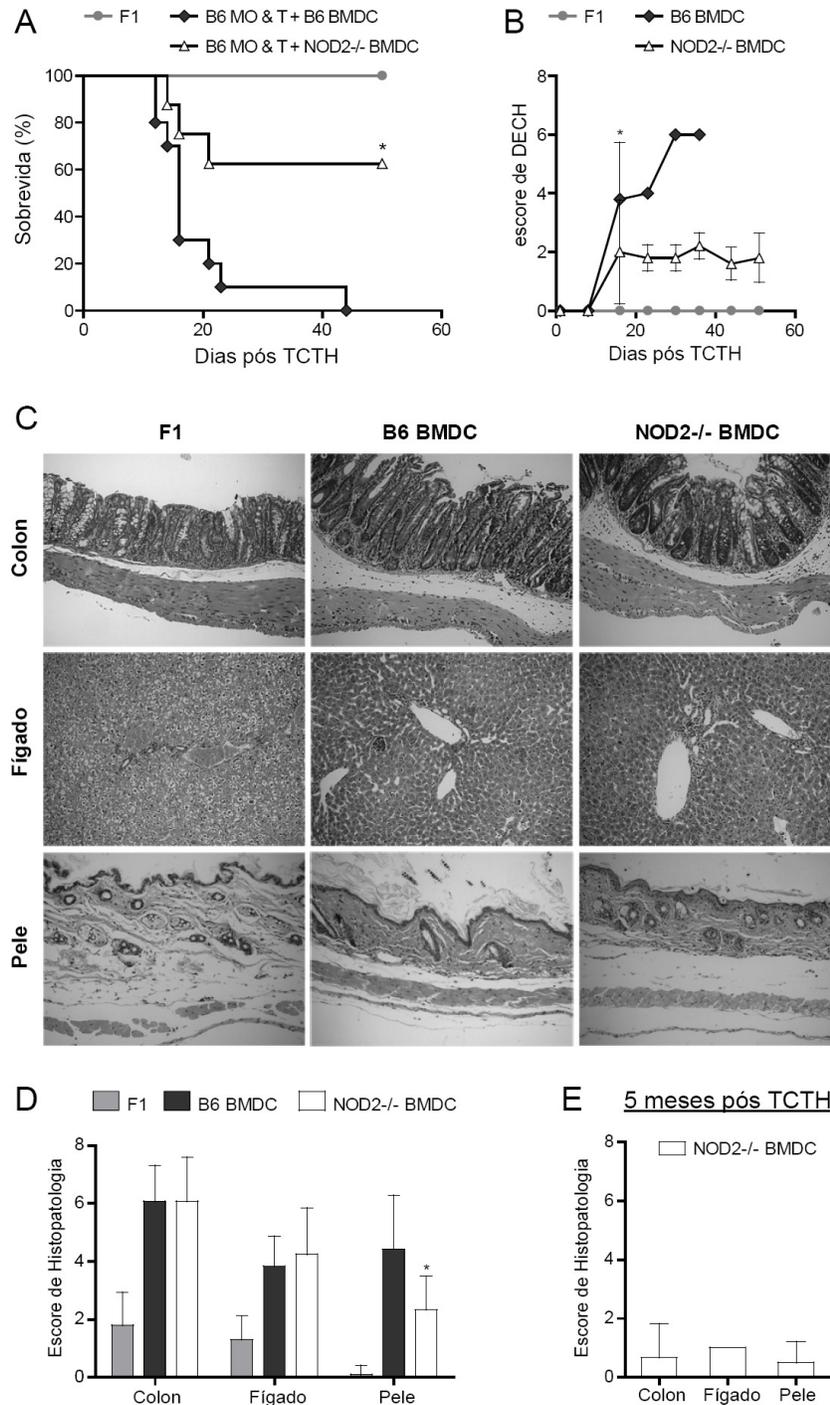


Figura 18. BMDCs NOD2 deficientes protegem da mortalidade pela GVHD: Animais F1 foram letalmente irradiados e receberam 5.10^6 células de MO e 5.10^6 linfócitos T purificados de doadores B6, além de BMDCs B6 ou NOD2^{-/-}. O controle singênico foram animais F1 que receberam as mesmas células de doadores F1. (A) Percentual de sobrevivência, * indica $P < 0,05$ para o teste de log rank entre os grupos B6 e NOD2^{-/-}. (B) Escore clínico total de DECH. (C) Histopatologia de cólon, fígado e pele 18 dias após TCTH (aumento de 200x). (D) Média de escores histopatológicos em 18 dias pós TCTH de 3 experimentos. (E) Escores histopatológicos dos animais do grupo NOD2^{-/-} 5 meses pós TCTH. Barras de erro representam desvio padrão e * indica $P < 0,05$ para two-way ANOVA entre os grupos B6 e NOD2^{-/-}. Um experimento representativo de 3 com n=8 animais por grupo.

Ao se analisar o soro dos animais de cada grupo, notou-se uma maior produção de G-CSF no grupo NOD2^{-/-} e uma menor produção de IFN- γ e KC quando comparadas as do grupo B6. Esta diferença se verificou em 6 e em 18 dias pós transplante. As demais citocinas medidas se encontraram comparáveis entre os grupos (figura 19).

Para verificar a possível ação de células reguladoras no processo de proteção dos animais do grupo NOD2^{-/-}, foram comparadas as freqüências e os números absolutos de células reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) presentes nos linfonodos mesentéricos e baço dos animais. A figura 19C mostra que não existiu diferença nos percentuais de células reguladoras entre os grupos NOD2^{-/-} e B6, e que houve uma ligeira diferença na freqüência de células T ativadas (CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁻) especialmente para os linfonodos mesentéricos (figura 19D). Entretanto, ao se estabelecer uma relação entre as células reguladoras e as células ativadas, observou-se que o grupo NOD2^{-/-} tem uma maior proporção de células T reguladoras para cada célula T convencional, tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos (figura 19E).

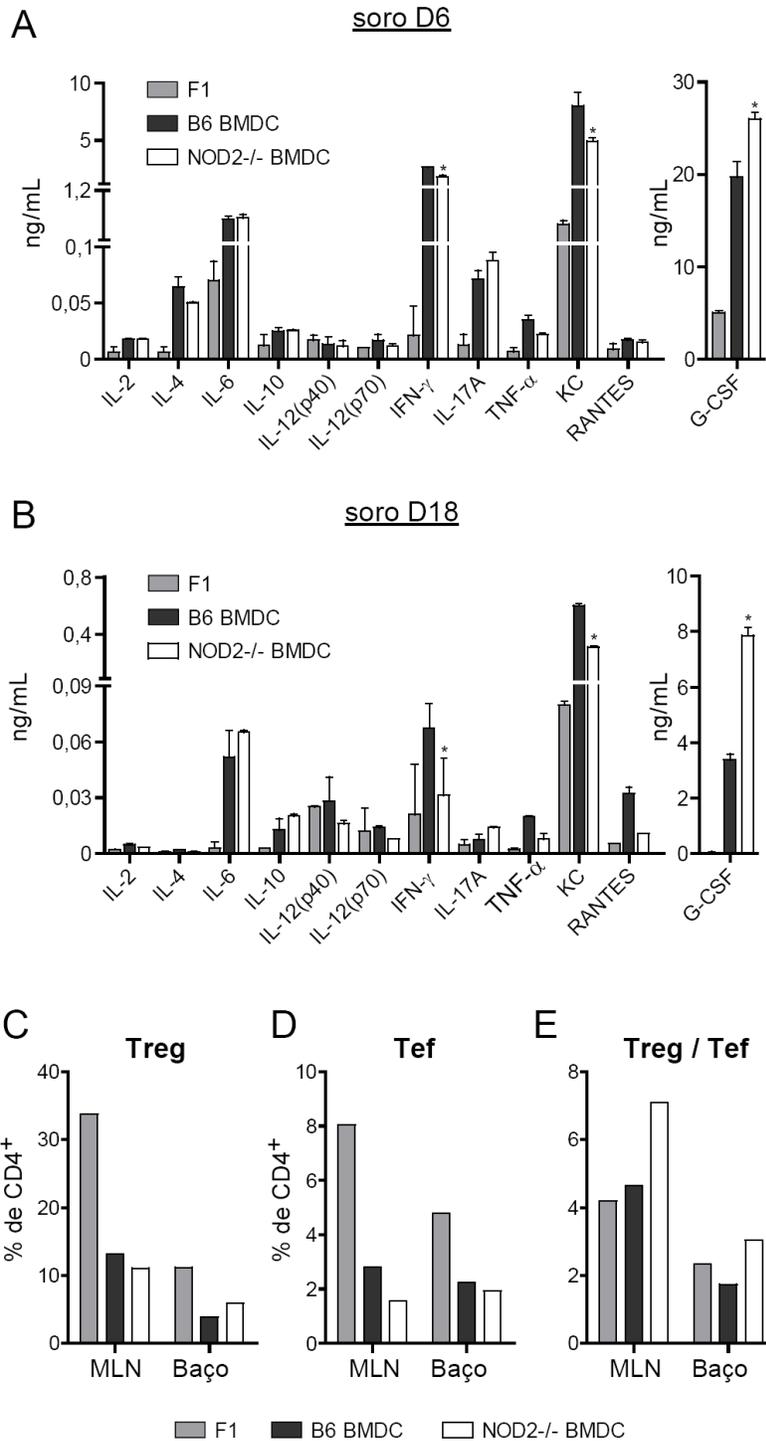


Figura 19. Animais que recebem BMDCs NOD2^{-/-} tem menos IFN- γ e mais G-CSF no soro, além de maior relação Treg/Tef: Seros de animais transplantados como descrito na figura 16 foram coletados após 6 (A) ou 18 (B) dias. As citocinas foram dosadas por multiplex ELISA ou ELISA convencional. Células de linfonodos mesentéricos e baço dos animais foram marcadas para CD4, CD25 e Foxp3 para a avaliação de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (C) ou Tef (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) (D) e a razão de Treg:Tef está mostrada em (E). Barras de erro representam desvio padrão e * indica $P < 0,05$ para two-way ANOVA entre os grupos B6 e NOD2^{-/-}. Um experimento representativo de 3 com n=8 animais por grupo.

Como foi observado um grande aumento nos níveis séricos de G-CSF no grupo protegido no TCTH, também foram verificados o hemograma e a hematopoese granulocítica desses animais. A análise do sangue periférico mostrou que em períodos precoces (6 dias pós transplante) o grupo NOD2^{-/-} apresenta maior percentual de neutrófilos segmentados e menor número de linfócitos, quando comparado ao do grupo B6. Esta diferença não se mantém em períodos posteriores, já que 20 dias após o TCTH as freqüências dessas células se apresentaram semelhantes. A MO destes animais também se apresentou com diferenças significativas em relação às freqüências de granulócitos, sendo que o grupo NOD2^{-/-} apresentou menor freqüência de granulócitos imaturos (em 6 e 20 dias após o TCTH) e maior freqüência de células maduras (em 6 dias após o TCTH). Os demais tipos celulares estudados não apresentaram diferenças significativas (figura 20). Além disso, se estabeleceu um protocolo para averiguar a situação dos precursores granulocíticos na MO, que foi realizado através de cultura do material medular em meio semi sólido na presença de fatores de crescimento. Neste caso, não se observou diferenças estatisticamente significativas em animais sacrificados em 6 dias pós TCTH, mas se verificou um menor número de colônias geradas nas culturas provenientes de animais NOD2^{-/-}, quando comparadas as de animais B6 (figura 20B).

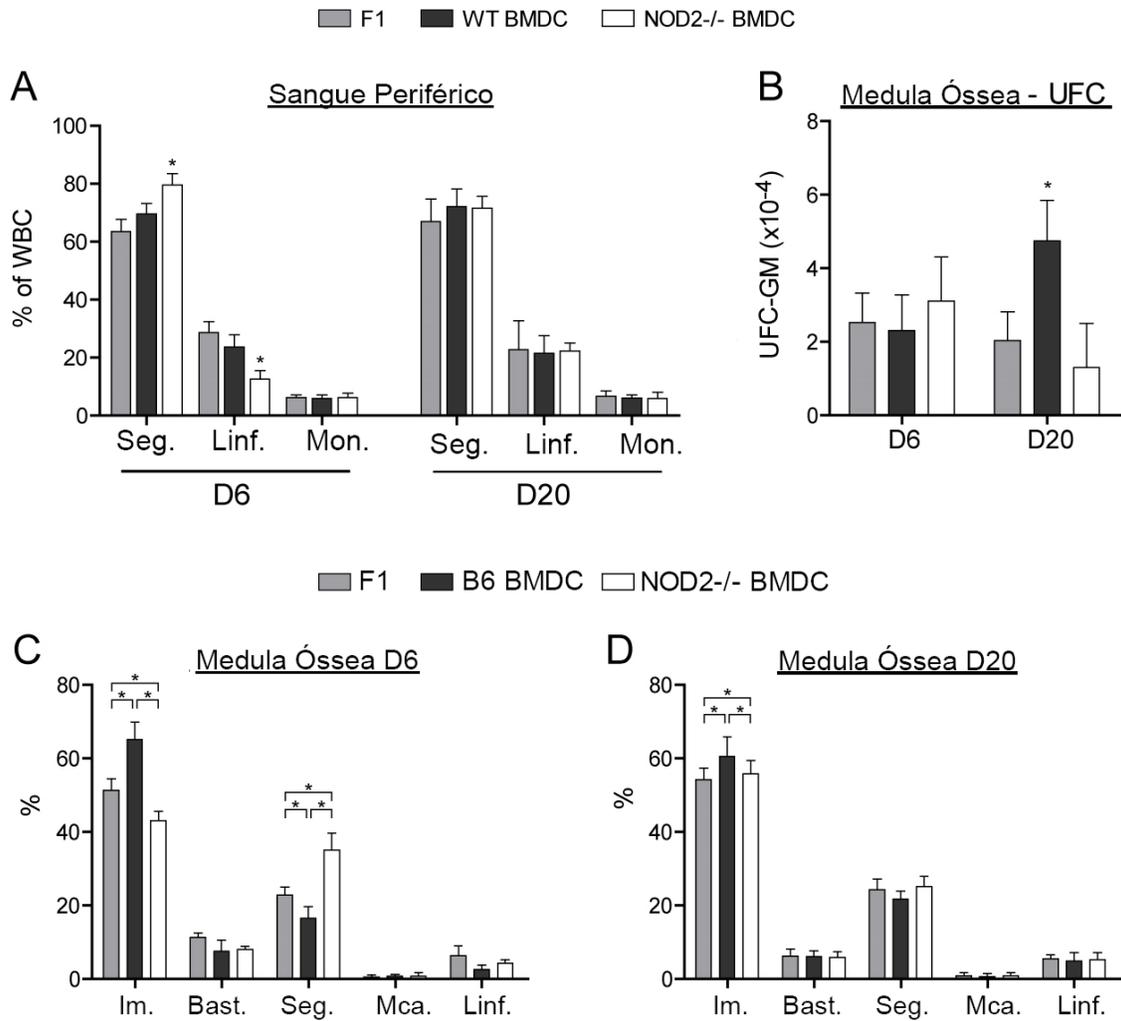


Figura 20. BMDCs NOD2^{-/-} aceleram a pega granulocítica pós TCTH: (A) O sangue periférico de animais transplantados como descrito na figura 16 foi coletado, o hemograma realizado em 6 ou 20 dias após TCTH e a contagem diferencial está mostrada. (B) MO colhidas 6 ou 20 dias pós TCTH foram cultivadas por 7 dias em presença de fatores de crescimento apropriados e o número de unidades formadoras de colônias granulocíticas está mostrado. Contagem celular diferencial. MO de animais transplantados foram coletadas, o citospin realizado em 6 (C) ou 20 (D) dias após TCTH e a contagem diferencial está mostrada. Barras de erro representam desvio padrão e * indica $P < 0,05$ para two-way ANOVA Um experimento representativo de 3 com n=8 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Até o momento de início deste trabalho, não existia qualquer literatura disponível sobre o papel da molécula NOD2 em modelo experimental de DECH. Sendo assim, tornou-se necessário estudar o papel desta molécula em todos os tecidos ou células em que ela é expressa. A primeira parte do trabalho visou compreender como a ausência de NOD2 nos tecidos rádio resistentes poderia impactar a DECH experimental. Dados em humanos reportam um papel desta molécula no compartimento rádio resistente (Holler *et al.*, 2004), o que foi comprovado pelo atual modelo experimental. Holler e colaboradores, em 2004 observaram que quando os receptores de um TCTH apresentavam polimorfismos em NOD2 havia um pior prognóstico de DECH, exatamente como o observado na figura 5. A mortalidade de animais NOD2^{-/-} se submetidos a TCTH alogeneico se mostrou maior quando comparada com animais selvagens. Quando os parâmetros clínicos foram considerados, uma tendência a exacerbação da doença também foi observada (figura 5B e C). Este resultado corrobora dados da literatura, onde se observou que recipientes com o compartimento linfóide deficiente em NOD2 apresentavam maior mortalidade por DECH (Penack *et al.*, 2009). Sendo assim, o presente trabalho ajuda a consolidar o papel da molécula NOD2 nos tecidos rádio resistentes na DECH, abrindo, com isso, um possível caminho para o surgimento de terapias que atuem neste receptor com o objetivo de controlar a DECH. Para tanto, seriam necessários estudos onde fosse administrado agonista de NOD2 aos animais submetidos a TCTH e, em se verificando a eficácia do tratamento, passar para testes clínicos em humanos.

Os resultados obtidos *in vitro*, neste trabalho, mostraram que células deficientes em NOD2 induzem uma maior produção de IL-17, quando ensaiadas numa cultura mista linfocitária. Quando as células estimuladoras eram deficientes em NOD2, sendo elas esplenócitos ou células dendríticas, estas foram capazes de estimular as células respondedoras (alogeneicas) de maneira qualitativamente

diferente de células selvagens. Os sobrenadantes destas culturas foram recolhidos após 2 e 4 dias de cultura e foram dosadas as citocinas IL-17 e IFN- γ , por ELISA. As culturas feitas com células NOD2^{-/-} apresentaram maior produção de IL-17 quando comparadas as culturas selvagens e não se observou diferenças significativas nas demais citocinas medidas (figuras 6, 8 e 9). Estes dados foram confirmados por marcação intracelular, onde maior porcentagem de células positivas para IL-17 estavam presentes em culturas com estimuladoras NOD2^{-/-}, estando os níveis de IFN- γ e IL-4 comparáveis entre as culturas (figura 8). Este fato chamou atenção, já que nestas culturas não é utilizado qualquer outro estímulo a não ser as células alogeneicas, ou seja, não se usa o agonista da molécula NOD2 nas culturas. Isto leva a duas possibilidades. A primeira seria que o fato de se desenvolver numa ambiente NOD2^{-/-} confere a estas células estimuladoras uma capacidade intrínseca de promover uma maior produção de IL-17 por linfócitos T estimulados alogenicamente por elas. Dados da literatura ligam a estimulação de NOD2 simultânea a estimulação de TLR2, TLR4 ou TLR5 em células dendríticas a uma maior capacidade de diferenciar células Th17 em camundongos e em humanos. Em camundongos existe uma diferenciação para Th17 de células T virgens e uma conversão ao perfil Th17 de células de memória. Em humanos ocorre apenas a conversão de células de memória para Th17 (Van Beelen *et al.*, 2007). Os dados aqui apresentados vão de encontro a este trabalho, já que aqui, as células NOD2^{-/-} induzem uma maior produção de IL-17. Há que se notar, porém, a diferença existente nos modelos citados, onde aqui tratamos de uma reação mista linfocitária e o estímulo para a ativação dos linfócitos T é alogenico e no trabalho de van Beelen e cols. de 2007, o estímulo é dado pela ativação da célula dendrítica com agonistas de TLRs e NOD2 além de um estímulo com superantígeno de *Staphylococcus aureus* (SEB) para a geração da resposta imune. Estas diferenças podem justificar os diferentes resultados observados aqui. Outro fator que fala a favor de uma atividade diferencial para células apresentadoras NOD2^{-/-} é o fato de animais NOD2^{-/-} terem uma fisiologia alterada no que tange o nível de ativação de suas células T, especialmente nas placas de Peyer (Barreau *et al.*, 2007). Animais deficientes em NOD2^{-/-} saudáveis

foram submetidos a dosagem de citocinas nas placas de Peyer e baço e observou-se uma maior percentagem de células CD4⁺ acompanhada de uma maior produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-4 nas placas de Peyer, mas não no baço destes animais, quando comparados a animais controle. Isto sugere que a molécula NOD2 tem um papel na diferenciação das células apresentadoras de antígeno e sua deficiência leva a alterações na capacidade desta célula de modular a resposta T subsequente. A segunda possibilidade seria de que o meio de cultura utilizado para as culturas esteja contaminado com ligantes de NOD2. Os meios de cultura utilizados para estes experimentos eram certificados pelo fabricante quanto a sua não pirogenicidade, porém, o único teste disponível no mercado dosa presença de LPS no meio de cultura, não sendo capaz de detectar outros possíveis contaminantes. Neste caso, uma contaminação com PGN, que contem o MDP, ligante de NOD2 poderia causar uma estimulação na cultura selvagem e o efeito causaria as diferenças observadas. Entretanto esta hipótese é muito remota, visto que a literatura demonstrou que a ativação de NOD2 simultânea a outro TLR gera mais IL-17, exatamente o oposto do que foi observado aqui.

Quando as células respondedoras eram NOD2^{-/-}, também se observou uma maior produção de IL-17 nas reações mistas linfocitárias, verificados através de ELISA e marcação intracelular (figuras 6, 8 e 9). Para eliminar a possibilidade desta diferença ser devido a uma ativação direta das células T respondedoras pelo MDP foi verificada a expressão de mRNA de NOD2 em células T CD4 e CD8 purificadas. Como esperado, já que não há descrição de expressão de NOD2 por células T, não se observou presença de mRNA de NOD2 em células T, enquanto que as células controle positivo (macrófagos peritoneais) apresentaram a banda correspondente a este RNA (figura 10). Sendo assim, a diferença observada deve ser devido a uma condição estabelecida *in vivo* nas células T. Isto fala a favor da hipótese das células apresentadoras NOD2^{-/-} terem uma capacidade inerente de gerar respostas Th17, onde, neste caso, as células provenientes do animal NOD2^{-/-} já viriam do camundongo com um perfil predefinido TH17. Não é possível definir se as células T seriam convertidas mais facilmente a Th17 ou se por ventura

existe uma geração de um maior percentual de células de memória Th17 no animal NOD2^{-/-}, que seriam ativadas na reação mista linfocitária e gerariam a maior produção de IL-17 observada. Para definir se este é realmente o caso, seria necessário fazer uma caracterização prévia das células a serem utilizadas como respondedoras, retirando-se, por exemplo, o contingente de memória da preparação e verificando se o efeito é abolido, além de se realizar o procedimento utilizando apenas células de memória e verificando se o efeito é amplificado.

Para excluir um possível papel da molécula NOD2 diretamente sobre a célula T, linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, purificados a partir de preparado de linfonodos de camundongos B6 (pureza superior a 99,9%, através de separação por citometria de fluxo) tiveram seu conteúdo de RNA mensageiro extraído e convertido a cDNA, para avaliação de uma possível expressão de mRNA de NOD2. Este preparado também teve avaliada a expressão de mRNA de TLR2, visto que ainda existe controvérsia na literatura sobre células T expressarem ou não TLRs. A figura 10 mostra que foi confirmada a expectativa de não haver mRNA codificante para NOD2 em linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺. Este resultado indica que células T não expressam o receptor NOD2, o que impediria uma ação direta deste receptor na célula. É possível que os efeitos decorrentes da deficiência de NOD2 observados em células T provenientes de animais NOD2^{-/-} se devam ao ambiente em que estas células amadurecem. Por outro lado a expressão de TLR2 foi detectada no preparado de mRNA de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, confirmando dados da literatura que já haviam dado conta da existência deste receptor nestes tipos celulares (Komai-Koma *et al.*, 2004).

Para analisar o compartimento rádio sensível no TCTH, foi escolhido um modelo semi-alogenico em que animais F1 (C57BL/6 X BALB/c) foram letalmente irradiados e receberam MO e baço total (como fonte de células T) de animais B6 ou NOD2^{-/-}. Este experimento foi inspirado na literatura disponível para TCTH em humanos, onde o papel da molécula NOD2 ainda é controverso (Penack, Holler & Van Den Brink). Os resultados mostrados na figura 11 mostram que quando os animais doadores eram deficientes em NOD2, os receptores tinham uma

sobrevida maior que os receptores de células de B6. Neste caso as células T, responsáveis pela DECH, eram provenientes de baço total, com o número de células corrigido para que houvesse 5.10^6 células T na preparação. Apesar de comum, este procedimento traz complicações para a interpretação dos resultados, visto que o papel exato de cada tipo celular presente nesta preparação não está elucidado, sendo assim, apesar de termos observado um efeito protetor, fica difícil creditar este efeito à(s) célula(s) realmente responsável por ele. Aqui observamos que tanto quando apenas a MO quanto quando apenas a fonte de células T foram de NOD2^{-/-} foi observado um efeito protetor, no que tange a mortalidade. Este efeito foi, entretanto, mais pronunciado quando se comparou o grupo que recebeu tanto MO quanto esplenócitos NOD2^{-/-} com o grupo controle positivo de mortalidade (MO + esplenócitos de B6). Para identificar o papel específico de cada tipo celular na DECH são utilizados protocolos com populações celulares purificadas, o que foi feito em seguida neste trabalho. A literatura mostra que a célula efetora da DECH é a célula T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ e que sem estas células na preparação não existe DECH, o que as tornam objeto de interesse no estudo da DECH (Maraninchi *et al.*, 1987; Glass *et al.*, 1998). Outra categoria celular que tem influência no desenvolvimento da DECH são as células apresentadoras de antígeno (Shlomchik *et al.*, 1999). Já está caracterizado que para as formas mais severas de DECH existe uma participação de células APC tanto do doador quanto do receptor (Anderson *et al.*, 2005). Os resultados mostrados na figura 11 dão margem a interpretações que contemplam ambas as possibilidades, sendo estas, que as células T NOD2^{-/-} teriam alguma diferença em sua ativação, o que não levaria a uma DECH tão severa ou que as células APC NOD2^{-/-} teriam uma capacidade alterada de desencadear uma resposta T, o que levaria a proteção observada.

A primeira hipótese testada foi a de haver alguma diferença na célula T do animal NOD2^{-/-}. Para este fim foi realizado um TCTH em que a fonte de células T foram linfócitos T purificados a partir de pool de linfonodos (>95% de pureza). Animais receptores F1 foram submetidos a TCTH em que recebiam MO de animais B6 e linfócitos T purificados provindos de B6 ou de NOD2^{-/-}. A figura 12

mostra que não houve diferença na mortalidade entre os grupos testados, tendo o grupo que recebeu células T NOD2^{-/-} tido mortalidade comparável ao grupo controle positivo de mortalidade. Este resultado exclui definitivamente que a célula T de animais NOD2^{-/-} seja a responsável pelo efeito protetor observado anteriormente.

Foi levantada a hipótese, então, que a proteção poderia ser concedida por células com capacidade apresentadora de antígeno, presentes no material de MO ou de baço de animais NOD2^{-/-}. A primeira tentativa de avaliar esta hipótese utilizou células fagocíticas com capacidade apresentadora, presentes no baço, como células teste. Estas células foram selecionadas através da expressão dos marcadores CD11b e CD11c, sendo enriquecidas a partir de baços de animais B6 ou NOD2^{-/-}. Devido ao baixo percentual destas células no baço e à limitações da técnica esta população não alcançou pureza superior a 60%. O protocolo experimental contou com animais receptores F1 que foram transplantados com MO e células T purificadas de B6, que foram, porém, divididos em 2 grupos, um que recebeu APCs de B6 e outro que recebeu APCs de NOD2^{-/-}. O grupo que recebeu células de NOD2^{-/-} teve uma proteção da mortalidade significativa em relação ao grupo B6. Esta proteção na mortalidade não foi acompanhada de proteção em nenhum parâmetro clínico avaliado, como aspecto do pêlo, atividade, perda de peso ou postura (figura 13). Após 18 dias de TCTH, 2 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados para avaliação de aspectos histopatológicos do cólon, fígado e pele. Em todos os tecidos verificados não houve diferenças nos escores histopatológicos, tendo os animais do grupo protegido da mortalidade, alterações tão severas quanto às do grupo controle de mortalidade (figura 14). Fica claro, portanto, que apesar de igualmente doentes em todos os parâmetros pesquisados uma alta porcentagem dos animais que recebem APCs de NOD2^{-/-} ficam protegidos da mortalidade, indicando uma diferença na qualidade da resposta em detrimento da quantidade desta.

A contraprova do experimento anterior foi feita com um experimento semelhante, em que as células CD11b⁺ e CD11c⁺ foram retiradas da preparação

de esplenócitos antes de serem administrados a camundongos receptores de um TCTH. Os grupos experimentais foram compostos de animais F1 que receberam MO e linfócitos T de B6 e foram divididos em 2 grupos onde um recebia células esplênicas CD11b⁻ e Cd11c⁻ provindas de B6 e outro destas provenientes de NOD2^{-/-}. Caso o efeito protetor fosse realmente exercido por estas células, a retirada destas da preparação aboliria o efeito. Como pode se observar na figura 16 não houve diferença na sobrevivência entre os grupos NOD2^{-/-} e B6, o que confirma o papel das células APCs no fenômeno.

Na tentativa de trabalhar com uma população mais pura, foi testado um protocolo no qual as células apresentadoras utilizadas foram células dendríticas diferenciadas com GM-CSF *in vitro* a partir de MO (BMDC). As células resultantes deste protocolo são 100% CD11b⁺ e 60-80% CD11c⁺. Este protocolo permite uma conclusão direta sobre a célula responsável pelo fenômeno de proteção eliminando o possível papel de contaminantes na preparação de esplenócitos. O ensaio utilizado aqui foi idêntico aos anteriores, com 2 grupos de F1 recebendo MO e linfócitos T de B6, diferindo entre si por um receber BMDC derivadas de B6 e o outro BMDCs derivadas de NOD2^{-/-}. Os animais que receberam células de NOD2^{-/-} tiveram uma sobrevida superior a 60% após 50 dias do transplante, enquanto que os que receberam células de B6 tiveram 0%. Esta diferença se refletiu nos parâmetros clínicos, tendo os animais do grupo NOD2^{-/-} desenvolvido alterações mais amenas do que os animais do grupo B6 (figura 18). Entretanto, quando as alterações histopatológicas são levadas em consideração, não houve diferenças na severidade das alterações para nenhum parâmetro avaliado, com exceção da pele, onde uma proteção é observada no grupo NOD2^{-/-} (figura 18D) Mais uma vez a histopatologia está muito semelhante entre os grupos protegido e controle positivo de mortalidade, o que indica uma inadequação destes parâmetros para prever o desfecho da DECH no que tange a mortalidade. Os parâmetros clínicos, por sua vez, indicam uma doença mais amena no grupo NOD2^{-/-} em relação ao grupo B6, fato que não havia sido observado no experimento usando APCs de baço. Esta diferença pode ser devido a uma maior pureza do material derivado de MO, assim como de uma maior funcionalidade

desta população, que é composta principalmente de células dendríticas. Além disso, o preparado de APCs do baço carrega uma quantidade diversa de tipos celulares contaminantes, os quais, não se sabe como podem influenciar no curso da GVHD, mas, como no caso dos linfócitos T, podem agravar a DECH.

Para caracterizar uma possível diferença no perfil da resposta entre os grupos que recebem APCs ou BMDCs de NOD2^{-/-} ou de B6, diversas citocinas foram dosadas no soro dos animais, em 6 ou 18 dias após o TCTH. Apenas um experimento com APCs esplênicas teve as citocinas determinadas, sendo a principal diferença encontrada o nível de G-CSF, que estava maior no grupo NOD2^{-/-} tanto em 6 quanto em 18 dias pós TCTH. Os níveis de IL-6 e KC também se encontraram elevados no grupo NOD2^{-/-} em 18 dias pós TCTH (figura 15). Três experimentos com BMDCs tiveram as citocinas do soro medidas e a concentração de G-CSF, como no experimento com APCs esplênicas, estava aumentada no grupo NOD2^{-/-}, com concentrações muito altas, especialmente em 6 dias pós TCTH. Entretanto, a dosagem de IFN- γ e KC revelou níveis significativamente menores de citocina no grupo NOD2^{-/-}, tanto em 6 quanto em 18 dias pós TCTH (figura 19). Não é possível saber ao certo o porquê dessas diferenças entre os dois modelos experimentais, mas, levando em consideração que são dois protocolos diferentes, os resultados sugeriram que o G-CSF, aumentado em todos os grupos protegidos, seja o responsável por salvar o animal da morte por DECH, mas não o suficiente para melhorar o desenvolvimento clínico da doença, que só é conseguido nos animais do grupo que recebe BMDCs de NOD2^{-/-}. Esta melhora no quadro clínico, então, pode ser devido a menor concentração de IFN- γ , o que já foi descrito na literatura (Mowat, 1989).

Para verificar se a proteção observada era provocada por uma geração de células T reguladoras, os linfonodos mesentéricos e baços dos animais que receberam BMDCs foram colhidos 20 dias após o transplante e o percentual de células T reg e T efetoras foi determinado (figura 19 C e D). Não se observou diferença quando se analisou o percentual de células Treg no baço ou linfonodos mesentéricos dos animais, mas a quantidade de células efetoras (CD4⁺, Cd25⁺,

Foxp3⁺) estava diminuída. No grupo controle singeneico observou-se um percentual superior de células reguladoras assim como de efetoras nos órgãos estudados em relação aos grupos B6 e NOD2^{-/-}. Como a inibição de células efetoras por reguladoras depende de uma questão numérica para que tenha sucesso, foi determinada a razão de células reguladoras por efetoras presentes em cada um dos grupos experimentais. Notou-se que apesar do maior percentual de células reguladoras no grupo singeneico isto resultou numa razão Treg/Tef similar a do grupo B6, mas a mesma razão para o grupo NOD2^{-/-} era maior (figura 19 E). Esta maior proporção de células reguladoras por cada efetora poderia explicar a existência de infiltrados tão robustos nas histologias dos animais protegidos. Caso o infiltrado mantenha a maior proporção de células reguladoras isto poderia levar a um melhor prognóstico de doença. Para tanto deve-se analisar o infiltrado destes cortes através de imunohistoquímica ou imunofluorescência para determinar as células CD4 Foxp3 positivas e negativas e estabelecer-se esta razão.

A questão do G-CSF foi abordada no que diz respeito aos possíveis efeitos que a produção desta molécula poderia acarretar na hematopoese. Caso a diferença observada no soro fosse de relevância biológica, alguma alteração na hematopoese deveria ser vista. Realmente foi o caso, já que o grupo NOD2^{-/-} apresentou maior maturação de granulócitos do que os outros dois grupos (B6 e controle singeneico). Após 6 dias de TCTH a MO e o sangue periférico de animais do grupo NOD2^{-/-} apresentou maior número de neutrófilos segmentados e após 18 dias esta diferença não existiu mais (figura 20). Isto sugere que a pega do transplante se daria mais rápido no grupo NOD2^{-/-}, o que proporcionaria uma maior proteção contra possíveis infecções além de um retorno mais rápido do indivíduo à sua fisiologia normal, o que poderia significar a diferença entre a sobrevivência observada nos grupos B6 e NOD2^{-/-}.

Sendo assim, nosso sistema revelou um papel dicotômico da molécula NOD2 na DECH. Quando receptores de um TCTH alogeneico foram deficientes em NOD2, estes apresentaram maior mortalidade e doença clínica mais severa.

Por outro lado, quando BMDCs deficientes em NOD2 foram infundidas num TCTH, juntamente com linfócitos T semialigeneicos, os animais apresentaram DECH mais branda acompanhada de menor mortalidade. Observou-se, neste caso, uma série de características associadas a essa maior sobrevida, tais como: menores concentrações séricas de IFN- γ e KC, maior concentração sérica de G-CSF, maior razão de Treg/Tef assim como uma “pega” acelerada do transplante. Nossos dados, não permitem, porém, a indicação exata de qual destes fatores (ou se algum destes) é o responsável pela proteção observada. Fica claro, entretanto, que NOD2 desempenha um papel neste sistema, tornando-se importante esclarecer definitivamente o mecanismo de ação das BMDC para seu possível uso como uma terapia para DECH.

6. Conclusões

- Animais deficientes em NOD2 são mais sensíveis a DECH quando receptores num TCTH.
- Células mieloides NOD2^{-/-} protegem da mortalidade por GVHD.
- BMDCs deficientes em NOD2 oferecem proteção da mortalidade e amenizam manifestações clínicas da DECH.
- Animais que recebem BMDCs NOD2^{-/-} apresentam menores níveis séricos de IFN- γ e KC.
- Animais que recebem BMDCs NOD2^{-/-} apresentam maiores níveis séricos de G-CSF.
- Os maiores níveis de G-CSF são acompanhados de “pega” granulocítica acelerada no TCTH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S. & K. TAKEDA. **Toll-like receptor signalling**. *Nat Rev Immunol*, 4(7), 499-511. 2004.
- AKIRA, S., S. UEMATSU & O. TAKEUCHI. **Pathogen recognition and innate immunity**. *Cell*, 124(4), 783-801. 2006.
- ANDERSON, B. E., J. M. MCNIFF, D. JAIN, B. R. BLAZAR, W. D. SHLOMCHIK & M. J. SHLOMCHIK. **Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ**. *Blood*, 105(5), 2227-34. 2005.
- BARNICH, N., T. HISAMATSU, J. E. AGUIRRE, R. XAVIER, H. C. REINECKER & D. K. PODOLSKY. **GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells**. *J Biol Chem*, 280(19), 19021-6. 2005.
- BARON, F., R. STORB & M. T. LITTLE. **Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress**. *Arch Med Res*, 34(6), 528-44. 2003.
- BARREAU, F., U. MEINZER, F. CHAREYRE, D. BERREBI, M. NIWA-KAWAKITA, M. DUSSAILLANT, B. FOLIGNE, V. OLLENDORFF, M. HEYMAN, S. BONACORSI, T. LESUFFLEUR, G. STERKERS, M. GIOVANNINI & J. P. HUGOT. **CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice**. *PLoS One*, 2(6), e523. 2007.
- BEELEN, D. W., A. ELMAAGACLI, K. D. MULLER, H. HIRCHE & U. W. SCHAEFER. **Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial**. *Blood*, 93(10), 3267-75. 1999.
- BEILHACK, A., S. SCHULZ, J. BAKER, G. F. BEILHACK, C. B. WIELAND, E. I. HERMAN, E. M. BAKER, Y. A. CAO, C. H. CONTAG & R. S. NEGRIN. **In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets**. *Blood*, 106(3), 1113-22. 2005.
- BILLINGHAM, R. E. **The biology of graft-versus-host reactions**. *Harvey Lect*, 62, 21-78. 1966.
- BONECA, I. G. **The role of peptidoglycan in pathogenesis**. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), 46-53. 2005.
- BROXMEYER, H. E. F. O. S. **Cord blood stem cell transplantation**. in: *Hematopoietic cell transplantation*. K. G. B. E.D. Thomas, and S.J. Forman, London, Blackwell Science, 1999.
- CALCATERRA, C., L. SFONDRINI, A. ROSSINI, M. SOMMARIVA, C. RUMIO, S. MENARD & A. BALSARI. **Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease**. *J Immunol*, 181(9), 6132-9. 2008.
- CHAMAILLARD, M., M. HASHIMOTO, Y. HORIE, J. MASUMOTO, S. QIU, L. SAAB, Y. OGURA, A. KAWASAKI, K. FUKASE, S. KUSUMOTO, M. A. VALVANO, S. J. FOSTER, T. W. MAK, G. NUNEZ & N. INOHARA. **An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid**. *Nat Immunol*, 4(7), 702-7. 2003.
- CHAO, N. J., S.G. EMERSON, K.I. WEINBERG. **Stem cell transplantation (cordblood transplants)**. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2004.

COOKE, K. R., A. GERBITZ, J. M. CRAWFORD, T. TESHIMA, G. R. HILL, A. TESOLIN, D. P. ROSSIGNOL & J. L. FERRARA. **LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation.** J Clin Invest, 107(12), 1581-9. 2001.

COOKE, K. R., G. R. HILL, J. M. CRAWFORD, D. BUNGARD, Y. S. BRINSON, J. DELMONTE, JR. & J. L. FERRARA. **Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease.** J Clin Invest, 102(10), 1882-91. 1998.

COOKE, K. R., K. OLKIEWICZ, N. ERICKSON & J. L. FERRARA. **The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease.** J Endotoxin Res, 8(6), 441-8. 2002.

DAMIANO, J. S., V. OLIVEIRA, K. WELSH & J. C. REED. **Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses.** Biochem J, 381(Pt 1), 213-9. 2004.

ELMAAGACLI, A. H., M. KOLDEHOFF & D. W. BEELEN. **Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9.** Bone Marrow Transplant, 44(5), 295-302. 2009.

ELMAAGACLI, A. H., M. KOLDEHOFF, H. HINDAHL, N. K. STECKEL, R. TRENDSCHL, R. PECENY, H. OTTINGER, P. M. RATH, R. S. ROSS, M. ROGGENDORF, H. GROSSE-WILDE & D. W. BEELEN. **Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation.** Transplantation, 81(2), 247-54. 2006.

FERRARA, J. L. **The cytokine modulation of acute graft-versus-host disease.** Bone Marrow Transplant, 21 Suppl 3, S13-5. 1998.

FLANAGAN, D. L., R. GROSS, C. D. JENNINGS, B. E. CAYWOOD, S. GOES, A. M. KAPLAN & J. S. BRYSON. **Induction of syngeneic graft-versus-host disease in LPS hyporesponsive C3H/HeJ mice.** J Leukoc Biol, 70(6), 873-80. 2001.

FOLIGNE, B., G. ZOUMPOPOULOU, J. DEWULF, A. BEN YOUNES, F. CHAREYRE, J. C. SIRARD, B. POT & C. GRANGETTE. **A key role of dendritic cells in probiotic functionality.** PLoS One, 2(3), e313. 2007.

FRITZ, J. H., L. LE BOURHIS, G. SELLGE, J. G. MAGALHAES, H. FSIHI, T. A. KUFER, C. COLLINS, J. VIALA, R. L. FERRERO, S. E. GIRARDIN & D. J. PHILPOTT. **Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity.** Immunity, 26(4), 445-59. 2007.

GERBITZ, A., M. SCHULTZ, A. WILKE, H. J. LINDE, J. SCHOLMERICH, R. ANDREESEN & E. HOLLER. **Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt.** Blood, 103(11), 4365-7. 2004.

GIRARDIN, S. E., I. G. BONECA, J. VIALA, M. CHAMAILLARD, A. LABIGNE, G. THOMAS, D. J. PHILPOTT & P. J. SANSONETTI. **Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.** J Biol Chem, 278(11), 8869-72. 2003.

GIRARDIN, S. E., R. TOURNEBIZE, M. MAVRIS, A. L. PAGE, X. LI, G. R. STARK, J. BERTIN, P. S. DISTEFANO, M. YANIV, P. J. SANSONETTI & D. J. PHILPOTT. **CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri.** EMBO Rep, 2(8), 736-42. 2001.

GIRARDIN, S. E., L. H. TRAVASSOS, M. HERVE, D. BLANOT, I. G. BONECA, D. J. PHILPOTT, P. J. SANSONETTI & D. MENGIN-LECREULX. **Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2.** J Biol Chem, 278(43), 41702-8. 2003.

GLASS, B., L. UHAREK, G. HARTUNG, M. ZEIS, J. STEINMANN, P. DREGER, M. KRONKE & N. SCHMITZ. **Immunotherapeutic aspects of allogeneic peripheral progenitor cells.** Bone Marrow Transplant, 21 Suppl 3, S3-8. 1998.

GRANELL, M., A. URBANO-ISPIZUA, J. I. AROSTEGUI, F. FERNANDEZ-AVILES, C. MARTINEZ, M. ROVIRA, J. RIUS, S. PLAZA, A. GAYA, A. NAVARRO, C. TALARN, E. CARRERAS, M. MONZO, E. MONTSERRAT & J. YAGUE. **Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation.** Haematologica, 91(10), 1372-6. 2006.

GRATAMA, J. W., J. KRAAN, W. LEVERING, D. R. VAN BOCKSTAELE, G. T. RIJKERS & C. E. VAN DER SCHOOT. **Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study.** Cytometry, 30(3), 109-17. 1997.

GRATWOHL, A. **Principles of conditioning regimens, in Hematopoietic stem cell Transplantation.** Paris, Institut de Recherche sur les Leucémies et les Maladies du Sang, 2004.

GRUHN, B., J. INTEK, N. PFAFFENDORF, R. ZELL, S. CORBACIOGLU, F. ZINTL, J. F. BECK, K. M. DEBATIN & D. STEINBACH. **Polymorphism of interleukin-23 receptor gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children.** Biol Blood Marrow Transplant, 15(12), 1571-7. 2009.

HART, D. P. & K. S. PEGGS. **Current status of allogeneic stem cell transplantation for treatment of hematologic malignancies.** Clin Pharmacol Ther, 82(3), 325-9. 2007.

HILL, G. R., J. M. CRAWFORD, K. R. COOKE, Y. S. BRINSON, L. PAN & J. L. FERRARA. **Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines.** Blood, 90(8), 3204-13. 1997.

HOLLER, E., G. ROGLER, J. BRENMOEHL, J. HAHN, H. HERFARTH, H. GREINIX, A. M. DICKINSON, G. SOCIE, D. WOLFF, G. FISCHER, G. JACKSON, V. ROCHA, B. STEINER, G. EISSNER, J. MARIENHAGEN, J. SCHOELMERICH & R. ANDREESEN. **Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination.** Blood, 107(10), 4189-93. 2006.

HOLLER, E., G. ROGLER, H. HERFARTH, J. BRENMOEHL, P. J. WILD, J. HAHN, G. EISSNER, J. SCHOELMERICH & R. ANDREESEN. **Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation.** Blood, 104(3), 889-94. 2004.

HOROWITZ, M. M., R. P. GALE, P. M. SONDEL, J. M. GOLDMAN, J. KERSEY, H. J. KOLB, A. A. RIMM, O. RINGDEN, C. ROZMAN, B. SPECK & ET AL. **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** Blood, 75(3), 555-62. 1990.

INOHARA, N., T. KOSEKI, L. DEL PESO, Y. HU, C. YEE, S. CHEN, R. CARRIO, J. MERINO, D. LIU, J. NI & G. NUNEZ. **Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB.** J Biol Chem, 274(21), 14560-7. 1999.

INOHARA, N., Y. OGURA, A. FONTALBA, O. GUTIERREZ, F. PONS, J. CRESPO, K. FUKASE, S. INAMURA, S. KUSUMOTO, M. HASHIMOTO, S. J. FOSTER, A. P. MORAN, J. L. FERNANDEZ-

LUNA & G. NUNEZ. **Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.** J Biol Chem, 278(8), 5509-12. 2003.

JANEWAY, C. A., P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.** Artmed, Porto Alegre, 2002.

JASPERSON, L. K., C. BUCHER, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, A. L. MELLOR, D. H. MUNN & B. R. BLAZAR. **Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality.** Blood, 114(24), 5062-70. 2009.

KAWAI, T. & S. AKIRA. **TLR signaling.** Semin Immunol, 19(1), 24-32. 2007.

KOBAYASHI, K., N. INOHARA, L. D. HERNANDEZ, J. E. GALAN, G. NUNEZ, C. A. JANEWAY, R. MEDZHITOV & R. A. FLAVELL. **RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems.** Nature, 416(6877), 194-9. 2002.

KOBAYASHI, K. S., M. CHAMAILLARD, Y. OGURA, O. HENEGARIU, N. INOHARA, G. NUNEZ & R. A. FLAVELL. **Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.** Science, 307(5710), 731-4. 2005.

KOMAI-KOMA, M., L. JONES, G. S. OGG, D. XU & F. Y. LIEW. **TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor.** Proc Natl Acad Sci U S A, 101(9), 3029-34. 2004.

LESAGE, S., H. ZOUALI, J. P. CEZARD, J. F. COLOMBEL, J. BELAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. O'MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, R. MODIGLIANI, C. GOWER-ROUSSEAU, J. MACRY, F. MERLIN, M. CHAMAILLARD, A. S. JANNOT, G. THOMAS & J. P. HUGOT. **CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.** Am J Hum Genet, 70(4), 845-57. 2002.

LISTER, J., J. F. GRYN, K. L. MCQUEEN, D. T. HARRIS, J. M. ROSSETTI & R. K. SHADDUCK. **Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy.** Stem Cells Dev, 16(1), 177-86. 2007.

LORENZ, E., D. A. SCHWARTZ, P. J. MARTIN, T. GOOLEY, M. T. LIN, J. W. CHIEN, J. A. HANSEN & J. G. CLARK. **Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation.** Biol Blood Marrow Transplant, 7(7), 384-7. 2001.

MAEDA, S., L. C. HSU, H. LIU, L. A. BANKSTON, M. IIMURA, M. F. KAGNOFF, L. ECKMANN & M. KARIN. **Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing.** Science, 307(5710), 734-8. 2005.

MARANINCHI, D., E. GLUCKMAN, D. BLAISE, D. GUYOTAT, B. RIO, J. L. PICO, V. LEBLOND, M. MICHALLET, F. DREYFUS, N. IFRAH & ET AL. **Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias.** Lancet, 2(8552), 175-8. 1987.

MARTINON, F. & J. TSCHOPP. **Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases.** Cell, 117(5), 561-74. 2004.

MAYOR, N. P., B. E. SHAW, D. A. HUGHES, H. MALDONADO-TORRES, J. A. MADRIGAL, S. KESHAV & S. G. MARSH. **Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors.** J Clin Oncol, 25(27), 4262-9. 2007.

MENDEZ-OTERO, R., G. R. DE FREITAS, C. ANDRE, M. L. DE MENDONCA, M. FRIEDRICH & J. OLIVEIRA-FILHO. **Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy.** *Regen Med*, 2(4), 417-23. 2007.

MICKELSON, E. E. W., PETERSDORF. **Histocompatibility, in Hematopoietic celltransplantation.** K. G. B. E.D. Thomas, and S.J. Forman, London, Blackwell Science, 1999.

MIMEAULT, M., R. HAUKE & S. K. BATRA. **Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies.** *Clin Pharmacol Ther*, 82(3), 252-64. 2007.

MOWAT, A. M. **Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction.** *Immunology*, 68(1), 18-23. 1989.

MURAI, M., H. YONEYAMA, T. EZAKI, M. SUEMATSU, Y. TERASHIMA, A. HARADA, H. HAMADA, H. ASAKURA, H. ISHIKAWA & K. MATSUSHIMA. **Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.** *Nat Immunol*, 4(2), 154-60. 2003.

NERVI, B., D. C. LINK & J. F. DIPERSIO. **Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization.** *J Cell Biochem*, 99(3), 690-705. 2006.

O'RIORDAN, M., C. H. YI, R. GONZALES, K. D. LEE & D. A. PORTNOY. **Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13861-6. 2002.

PENACK, O., E. HOLLER & M. R. VAN DEN BRINK. **Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors.** *Blood*, 115(10), 1865-72.

PENACK, O., O. M. SMITH, A. CUNNINGHAM-BUSSEL, X. LIU, U. RAO, N. YIM, I. K. NA, A. M. HOLLAND, A. GHOSH, S. X. LU, R. R. JENQ, C. LIU, G. F. MURPHY, K. BRANDL & M. R. VAN DEN BRINK. **NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease.** *J Exp Med*, 206(10), 2101-10. 2009.

PHILPOTT, D. J., S. YAMAOKA, A. ISRAEL & P. J. SANSONETTI. **Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells.** *J Immunol*, 165(2), 903-14. 2000.

QUESENBERRY, P. J., G. COLVIN & M. ABEDI. **Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond.** *Exp Hematol*, 33(1), 9-19. 2005.

RAKOFF-NAHOUM, S., J. PAGLINO, F. ESLAMI-VARZANEH, S. EDBERG & R. MEDZHITOV. **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** *Cell*, 118(2), 229-41. 2004.

REDDY, P. & J. L. FERRARA. **Immunobiology of acute graft-versus-host disease.** *Blood Rev*, 17(4), 187-94. 2003.

SAIRAFI, D., M. UZUNEL, M. REMBERGER, O. RINGDEN & J. MATTSSON. **No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT.** *Bone Marrow Transplant*, 41(11), 961-4. 2008.

SAMUEL, G. N., I. H. KERRIDGE, M. VOWELS, A. TRICKETT, J. CHAPMAN & T. DOBBINS. **Ethnicity, equity and public benefit: a critical evaluation of public umbilical cord blood banking in Australia.** *Bone Marrow Transplant*, 40(8), 729-34. 2007.

SHLOMCHIK, W. D., M. S. COUZENS, C. B. TANG, J. MCNIFF, M. E. ROBERT, J. LIU, M. J. SHLOMCHIK & S. G. EMERSON. **Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells.** *Science*, 285(5426), 412-5. 1999.

STROBER, W., P. J. MURRAY, A. KITANI & T. WATANABE. **Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2.** *Nat Rev Immunol*, 6(1), 9-20. 2006.

TAKATSUKA, H., T. IWASAKI, T. OKAMOTO & E. KAKISHITA. **Intestinal graft-versus-host disease: mechanisms and management.** *Drugs*, 63(1), 1-15. 2003.

TAYLOR, P. A., M. J. EHRHARDT, C. J. LEES, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, A. M. KRIEG, A. H. SHARPE, W. J. MURPHY, J. S. SERODY, H. HEMMI, S. AKIRA, R. B. LEVY & B. R. BLAZAR. **TLR agonists regulate alloresponses and uncover a critical role for donor APCs in allogeneic bone marrow rejection.** *Blood*, 112(8), 3508-16. 2008.

TIERCY, J. M., M. BUJAN-LOSE, B. CHAPUIS, A. GRATWOHL, J. GMUR, R. SEGER, M. KERN, A. MORELL & E. ROOSNEK. **Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1-matched donor?** *Bone Marrow Transplant*, 26(4), 437-41. 2000.

TRINCHIERI, G. & A. SHER. **Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence.** *Nat Rev Immunol*, 7(3), 179-90. 2007.

UEHARA, A., Y. FUJIMOTO, A. KAWASAKI, S. KUSUMOTO, K. FUKASE & H. TAKADA. **Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1.** *J Immunol*, 177(3), 1796-804. 2006.

VAN BEELEN, A. J., Z. ZELINKOVA, E. W. TAANMAN-KUETER, F. J. MULLER, D. W. HOMMES, S. A. ZAAT, M. L. KAPSENBERG & E. C. DE JONG. **Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells.** *Immunity*, 27(4), 660-9. 2007.

VAN BEKKUM, D. W. & S. KNAAN. **Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction.** *J Natl Cancer Inst*, 58(3), 787-90. 1977.

VAN DER VELDEN, W. J., N. M. BLIJLEVENS, F. M. MAAS, N. P. SCHAAP, J. H. JANSEN, B. A. VAN DER REIJDEN, T. FEUTH, H. DOLSTRA & J. P. DONNELLY. **NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted haematopoietic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant*, 44(4), 243-8. 2009.

WATANABE, T., A. KITANI, P. J. MURRAY & W. STROBER. **NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses.** *Nat Immunol*, 5(8), 800-8. 2004.

WELNIAK, L. A., B. R. BLAZAR & W. J. MURPHY. **Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Annu Rev Immunol*, 25, 139-70. 2007.

8. Anexos, artigos

DONOR BONE MARROW DENDRITIC CELLS FROM NOD2 DEFICIENT MICE INHIBIT ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE

Ramon Lemos,^{1,2} Rômulo B. Areal,¹ Rômulo G. Galvani,¹ Ana Paula G. Alves,¹ Pollyanna A. Salvador,¹ João Paulo Monteiro,^{1*} Dario S. Zamboni,³ and Adriana Bonomo^{1,2}

¹Divisão de Medicina Experimental, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ²Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and ³Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

*JPM is a Pew Fellow in the Biomedical Sciences. Present Address: Lymphocyte Biology Section, Laboratory of Immunology, NIAID/NIH, Bethesda, USA

Abstract word count: 198

Text word count: 4386

Figure count: 6 (+2 supplements)

Reference count: 50

Running head: Nod2^{-/-} BMDC inhibits aGVHD

Section: TRANSPLANTATION

Corresponding Author

Adriana Bonomo

Rua André Cavalcanti 37/ 6º andar,

Centro, Rio de Janeiro, Brasil CEP 20231-050

Phone number: 55(21)3233-1497

Fax number: 55(21)3233-1423

Email: abonomo@inca.gov.br

Abstract

The impact of the intracellular pattern recognition receptor NOD2/CARD15 as an independent risk factor for the development of acute graft versus host disease (aGVHD), in human stem cell transplantation (SCT) remains controversial. Regarding experimental studies there is one report showing that Nod2 in the hematopoietic cells of the recipient is important to protect from aGVHD when donor and recipient are either completely allogeneic or congenic for the MHC. We approached this issue by using a semi-allogeneic mouse model of aGVHD. We found that bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) from Nod2 deficient mice protected recipients from aGVHD, when given together with the transplanted cells. Nonetheless Nod2^{-/-} BMDCs did not differ from wild type cells for expression of surface markers and cytokine secretion. Nod2^{-/-} BMDC protection was accompanied by a decreased number of effector T cells, lower interferon- γ serum levels, and an increase in the regulatory/effector T cell ratio. Regarding hematopoiesis, high serum concentration of G-CSF was observed, which paralleled a faster engraftment, contributing to the protective effect.

Altogether, our data shows that dendritic cells from Nod2 deficient mice regulate T cell response and hematopoiesis in allogeneic SCT, placing the NOD2 molecule as a promising target for novel therapeutic interventions.

Introduction

Acute Graft Versus Host Disease (aGVHD) is the major complication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Intestines, skin and liver are the main organs involved in the acute disease and curiously all of them are exposed to microbial antigens .

The relationship between infections, or even the microflora and development of aGVHD has been proposed almost 40 years ago in the experimental model(Van Bekkum *et al.*, 1974) and confirmed in humans later on.(Vossen *et al.*, 1990) With those results in mind, intestinal decontamination became a common practice in HSCT,(Storb *et al.*, 1983; Vossen *et al.*, 1990) specially when there is a high risk of developing GVHD either in matched unrelated transplants or in related, but not fully matched HLA.(Bjorklund *et al.*, 2007)

More recently, with the description of pattern recognition receptors (PRR) in innate immune cells(Medzhitov, Preston-Hurlburt & Janeway, 1997; Cook, Pisetsky & Schwartz, 2004) and the understanding of its subsequent role in the activation of DCs and consequently of lymphocytes,(Kaisho & Akira, 2001) several authors have studied the role of some PRRs in aGVHD development.

Ferrara's group had shown that the radiation dose correlated with disease severity and also with the amount of LPS and TNF- α detected in the serum of irradiated mice.(Hill *et al.*, 1997) Moreover LPS antagonism could protect from GVHD.(Cooke *et al.*, 2001) The authors postulated that even before the entry of T cells, responsible for the disease,(Korngold & Sprent, 1978) the host milieu, submitted to the conditioning regimen, is activated by the microbial flora in such a way that donor T cells find the adequate environment within the host to be activated and trigger disease. This was called the first phase of aGVHD and its importance was corroborated by other findings showing not only that decontamination could diminish disease but that treatment with probiotics could also protect mice from aGVHD as well.(Gerbitz *et al.*, 2004)

Beside the studies aforementioned indirectly suggesting the involvement of TLR4 in GHVD pathogenesis, other PRRs have also been involved in triggering the first phase of aGVHD. Studies with TLR molecules had shown that TLR7, 8 and 9(Taylor *et al.*, 2008) were involved in disease modulation. In apparent contradiction with those results, Slavin's group had shown that pre-treatment with LPS protect the animals from GVHD.(Abdul-Hai *et al.*, 2006) The protection could result from LPS tolerance which turns off the innate response after a primary exposure to this PAMP.(Biswas & Lopez-Collazo, 2009)

In humans, studies on the impact of the innate immune receptors polymorphisms on GHVD are not conclusive. Analysis of TLR4 and 9 SNPs suggest a role for these PRRs in the outcome after HSCT, but if the effect is whether related to the anti-graft reaction or to infections is not clear.(Lorenz *et al.*, 2001; Elmaagacli, Koldehoff & Beelen, 2009) Regarding NLRs the data is even more confusing. Polymorphisms of the NOD2/CARD15 intracellular receptor have been suggested as a high risk variable for the development of aGVHD in 4 studies,(Elmaagacli *et al.*, 2006; Holler *et al.*, 2006; Holler *et al.*, 2008; Van Der Velden *et al.*, 2009) either when the polymorphism is carried by donor or by the recipient. Other 3 studies show no differences in aGVHD occurrence in the presence of any NOD2 SNPs.(Granell *et al.*, 2006; Mayor *et al.*, 2007; Sairafi *et al.*, 2008) In two of those, decreased overall survival was observed in the absence(Granell *et al.*, 2006) or presence of relapse.(Mayor *et al.*, 2007) In one study however, the presence of variant forms of NOD2 in the donor cells promotes protection, bellowing the incidence of severe aGVHD to

zero.(Elmaagacli *et al.*, 2006) In experimental model there is one study showing that NOD2 in the hematopoietic cells of the recipient is important to protect from aGVHD(Penack *et al.*, 2009) when donor and recipient are either completely allogeneic or congenic for the MHC.

In this report we addressed the role of NOD2 using a semi-allogeneic model of GVHD. We found that when bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from Nod2 deficient mice are given together with the transplanted cells the recipients are protected from aGVHD. However, BMDCs from Nod2 null mice did not seem different from wild type cells for expression of surface markers and cytokine secretion. Importantly they do not show skewed anti-inflammatory cytokine production. Serum levels of IFN- γ in animals treated with Nod2^{-/-} BMDC are lower when compared to controls, indicating a diminution in the numbers of T effector cells or effector activity. *In vivo*, indeed, the ratio between Treg:Teff is higher in protected mice, suggesting an inhibitory effect of Nod2^{-/-} DCs on the late phase of aGVHD, which is mediated mostly by cells of the adaptive immunity. In addition the inhibitory effect is also exerted on the early phase of disease, which is mainly mediated by innate immune cells, when high amounts of G-CSF are produced. This increase in G-CSF parallels an earlier hematopoietic reconstitution that can provide protection against infections and impact on the GVHD outcome. The improved engraftment and increased Treg:Teff ratio could explain the protection induced by DCs from Nod2 deficient mice.

Materials and Methods

Animals

C57BL/6 (H-2^b) (B6WT) , BALB/c (H-2^d) and F1 (C57BL/6 x BALB/c - H-2^{bxd}) mice were bred at the Instituto Nacional de Câncer animal facility (Rio de Janeiro, Brazil). Nod2^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Richard Flavell and backcrossed to C57BL/6 for eight generations (B6Nod2^{-/-}). Animals used as hosts in the transplantation protocols were 12 to 14 weeks old. All other animals were 8 to 10 weeks old. All mice were housed in sterilized micro-isolator cages and were handled according to our institutional guidelines.

Bone marrow transplantation

One day before transplantation, F1 recipients received 950 cGy and B6 WT or B6 Nod2^{-/-} recipients received 1000 cGy total body irradiation (TH780C irradiator with a cobalt Co 60 [⁶⁰Co] source). On the next day, recipients received 5x10⁶ bone marrow cells from healthy donors (T-cell depleted when indicated) along with T cells (5x10⁶ T cells) either from total spleen or purified from lymph nodes as indicated, from BALB/c, C57BL/6 or Nod2^{-/-}. In the experiments using antigen presenting cells (APCs) (non-T, non-B and non-NK spleen), 2x10⁶ cells were infused in the recipients. These APCs were obtained from Dynabeads or magnetic (MACS) separation of splenocytes (depletion of T, B and NK cells). When BMDC were used, 1x10⁶ cells were injected. The counterproof of the APCs function was tested infusing 1.2x10⁷ spleen cells MACS-depleted of CD11c, CD11b, CD4 and CD8.

GVHD assessment

A GVHD score was modified from the literature (Brok *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1996) and performed based on 4 parameters: weight loss, posture, activity and fur texture. Histopathologic examination of colon, liver and skin was performed 18-21 days after transplantation. All samples were fixed with formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and evaluated by light microscopy. A scoring system was modified from the literature (Ferrara *et al.*, 1986; Hill *et al.*, 1998; Van Den Brink *et al.*, 2000; Welniak *et al.*, 2000) Each organ was evaluated for individual parameters, which receive a value from 0 to 2, accordingly to severity. The final score of each organ was then obtained by the sum of the parameters. The following parameters were evaluated for the respective organ - Skin: inflammatory infiltration, fibrosis and loss of appendages, epidermal changes, ulceration; Liver: global parenchyma changes, changes in the portal space, inflammatory infiltration, parenchyma suffering; Colon: lamina propria infiltration, deeper layer infiltration, structural changes, damage extension.

Dendritic cell generation

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were generated from B6 WT and B6 Nod2^{-/-} in complete Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma Chemical, MO, USA) containing 10% fetal bovine serum, supplemented with 20 ng/mL recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). 2x10⁵ cells/mL were placed in 10 mL. On day 3, 5 mL of the same medium containing 20 ng/mL of GM-CSF was added. On day 6, 7 mL of medium was substituted for fresh GM-CSF-containing medium and by day 8 cells were gently harvested to obtain the non-adherent cells.

Flow cytometry

FITC, APC and purified anti-mouse CD4 (GK1.5); PE and purified anti-mouse CD8a (53-6.7); PE anti-mouse CD25 (7D4); APC anti-rat/mouse Foxp3 staining kit (FJK-16); FITC and PECy5 anti-mouse CD3e (145-2C11); FITC and PE anti-mouse IL-17 (eBio17B7); PE anti-mouse IFN- γ (XMG1.2); APC anti-mouse IL-4 (11B11); PECy5 anti-mouse Gr1 (RB6-8C5); biotinylated and PECy5 anti-mouse CD11c (HL3, N418); biotinylated and FITC anti-mouse CD11b (M1/70); PE anti-mouse B220 (RA3-6B2); FITC anti-mouse CD80 (16-10A1); PE anti-mouse CD83 (Michel17); FITC anti-mouse CD86 (GL1); biotinylated anti-mouse I-A/I-E (2G9); PE anti-mouse SCA1 (D7); biotinylated anti-mouse TER119 (Ly-76); Biotinylated anti-mouse pan-NK (DX5); APC anti-mouse cKit (ACK2); and FITC, PE and APC streptavidins were all purchased from eBioscience, CA, USA. For surface staining, cell suspensions were preincubated in 2% normal mouse serum (NMS) in PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) on ice to block FcRgII/III receptors, followed by incubation with appropriate antibodies for 15 min. For Foxp3 staining, cells were subjected to eBioscience KIT standard protocol. All samples were acquired in a FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA). Acquisitions were performed using CellQuest software (BD Biosciences) and analyses were performed using CellQuest or Summit V4.3 software (DAKO, Colorado, USA).

Magnetic cell separation

To obtain APC population, splenic cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-B220 and anti-CD49b (pan-NK) biotinylated antibodies for 30 min. on ice. After washing the antibodies FITC-conjugated streptavidin was added for 15 min and washed out for the addition of anti-FITC-conjugated magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, CA, USA). The negative selection of cells was carried out as indicated by the manufacturer. To obtain the non-APC population of the spleen the same procedure was performed with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b and anti-CD11c biotinylated antibodies.

For T cell purification, pooled lymph nodes (axillaries, brachials, inguinals, popliteals, mandibularis and mesenterics) were labeled with anti-B220, anti-CD11b and anti-CD11c rat anti-mouse IgG antibodies for 30 min on ice. After washing out the antibodies, goat anti-rat IgG Dynabeads (Invitrogen, CA, USA) was added and the cell separation was carried out as indicated by the manufacturer. Preparations were at least 95% CD3 positive.

Cytokine detection

ELISA kits for IL-10 and IFN- γ were purchased from BD Biosciences, IL-17 and IL-23 kits were from eBioscience and G-CSF kit was from R&D (R&D System, MN, USA). Luminex kits were purchased from BD Biosciences and Millipore (Millipore, MA, USA). The proceedings were carried out as specified by the manufacturers.

Statistical analysis

Data were analyzed using one-way or two-way ANOVA with Bonferroni post-test. Survival data were analyzed with log-rank test. Error bars represent Standard Deviation and * indicate $P < .05$.

Results

NOD2^{-/-} bone marrow cells protect from GVHD.

To evaluate the involvement of NOD2 in the acute model of GVHD, BALB/c BM and T lymphocytes were transplanted into B6 Nod2 deficient animals. Disease exacerbation, similar to what had been previously shown by others (Penack *et al.*, 2009) was observed in terms of survival (Figure 1A) and clinical parameters (Figure S1 - Supplemental Material). On the other hand, when B6 Nod2^{-/-} mice were used as BM and/or spleen donors to semi-allogeneic recipients, there was a tendency toward protection (Figure 1B). This was particularly important when the BM cells came from B6 Nod2^{-/-} animals. Almost no protection was observed when only the spleen cells, but not the BM, came from Nod2 deficient mice (Figure 1B). This inhibition of aGVHD occurred even when the spleen cells were from B6 WT if Nod2^{-/-} BM was used, although this effect was more pronounced when both, BM and spleen cells, were deficient in Nod2 (Figure 1B).

To definitely rule out a role for NOD2 in the T cell compartment, transplants using purified T cells instead of whole spleen were performed. The results shown in Figure 2A and Figure S2A confirmed that, indeed, Nod2^{-/-} T cells did not play any role in the protection observed in the presence of whole spleen. Of note is the fact that in these experiments the BM cells

were from B6 WT. When B6 Nod2^{-/-} BM was transplanted with purified B6 WT lymphocytes the protection was maintained (Figure 2B). On the other hand, if the transplant was done with B6 WT BM and purified WT T cells along with the B6 Nod2^{-/-} spleen depleted of lymphocytes (non-L ϕ Sp), the protective effect was even better than the one observed before, showing that a non-T, non-B and non-NK population mediates the observed suppression (Figure 2C and Figure S2B).

NOD2 deficient DC impairs the establishment of aGVHD

The experiments shown until now indicate that the absence of NOD2 in the myeloid component present in the bone marrow and spleen could be the mediator of the protection observed. One good candidate could be dendritic cells, since it had been shown that donor antigen presenting cells (APCs) could influence the outcome of GVHD.(Anderson *et al.*, 2005)

As shown in Figure 2C, the non-lymphoid component of the Nod2 deficient spleen was able to protect the mice from aGVHD in the semi-allogeneic system used. We asked if this was dependent on CD11b/CD11c positive cells. F1 recipients were irradiated and injected with BM and purified T cells from B6 WT mice, in the presence of B6 WT or Nod2^{-/-} spleen cells depleted of T cells and of CD11b/CD11c (non-APC Sp). Figure 2D clearly indicates the absence of protection when spleen cells from B6 Nod2^{-/-} mice were depleted of CD11b/CD11c cells. The survival rate was not different between the groups receiving non-APC spleen cells from B6 WT or Nod2^{-/-} mice. When clinical scores were considered, small variations could be seen, but the total clinical score showed no difference between the two experimental groups (Figure 2 D - bottom). The data shown strongly suggest that DCs could be the important elements involved in the aGVHD protection induced by a myeloid cell from B6 Nod2^{-/-} mice. To address this issue, bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were generated from B6 WT and Nod2^{-/-} mice, partially characterized and tested *in vivo* (Figures 3 and 4).

Expression of co-stimulatory molecules and MHC class II on both populations looked very similar. CD86 and MHC class II had similar levels of expression taken by the MFI and relative number of positive cells. When CD80 is analyzed, the relative number of positive cells in the total population was smaller in WT BMDC when compared to Nod2^{-/-} BMDC. However, the Nod2^{-/-} BMDC clearly showed the presence of two populations for CD80, where 69% of the cells were positive for the expression of this co-stimulatory molecule, and had similar MFI to the WT BMDC (Figure 3A).

To address if deficiency in the Nod2 molecule could lead to any particular cytokine profile, WT and Nod2^{-/-} BMDC were stimulated or not and the supernatants analyzed using multiplex ELISA (Figure 3B and C). As can be seen, the cytokine profile was very similar between WT and Nod2^{-/-} BMDC.

Although DCs from B6 WT and Nod2^{-/-} mice were not very different when studied *in vitro*, *in vivo* they provided quite different aGVHD outcomes. Lethally irradiated F1 were transplanted with BM and purified T cells from B6 WT, together with one million BMDC from B6 WT or B6 Nod2^{-/-} mice. As noted in Figure 4A, animals receiving Nod2^{-/-} BMDC showed a higher survival rate (more than 60%) 50 days after the transplant, when compared with recipients that received WT BMDC (0%). This protection was also clear when clinical scores (Figure 4B) findings were considered.

The histopathological scores, on the other hand, do not seem to accompany the clinical protection observed (Figure 4C), except for the skin, where the histopathological score was lower in Nod2^{-/-} BMDC injected mice compared with control animals. Liver and colon from clinically protected mice scored as bad as the WT BMDC receiving controls. Infiltration of mononuclear cells in Nod2^{-/-} BMDC treated mice was as extensive as in non-protected controls (Figure 4D). One possibility to explain these findings could consider the quality/balance of the infiltration regarding regulatory and effector cells. The mesenteric lymph nodes draining the intestines in fact showed that this was the case (see below). Since most of Nod2^{-/-} BMDC receiving mice survive, histopathology was evaluated at later time points. As noted in figure 4E, 5 months post-transplant the histopathology findings mostly disappear, indicating that indeed Nod2^{-/-} BMDC induces long lasting aGVHD suppression.

Increased Treg:Teff ratio induced by BMDC deficient for NOD2

To understand the inhibition induced by BMDC lacking the NOD2 molecule, cytokines present in the serum of the three groups of animals – F1 into F1, B6 WT BM & T + B6 WT BMDC into F1, and B6 WT BM & T + B6 Nod2^{-/-} BMDC into F1 - were evaluated. On day 6 and 18 after transplantation a significant diminution in the levels of IFN- γ and KC were observed in the group receiving Nod2^{-/-} BMDC (Figure 5A and B). Importantly, the levels of G-CSF were extremely high in all groups, especially at early time points (day 6), but were even higher in the Nod2^{-/-} BMDC group (Figure 5A and B). Curiously, the levels of KC and G-CSF correlates with the *in vitro* findings in Figure 3C, suggesting an important and direct role for NOD2 in regulating these cytokines.

When inhibitory cytokines are considered, no difference in the levels of IL-10 were observed (Figure 5A and B), suggesting that Tr1 cells are not involved in the observed inhibition. However, Foxp3⁺ regulatory T cells seem to be playing some role. If the relative numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells are considered, the F1 syngeneic control showed high numbers in mesenteric lymph nodes and spleen, compatible with a physiological steady state when 10% of CD4⁺ cells are regulatory (Almeida *et al.*, 2002) or a suppressive state with even more Tregs in the spleen (Figure 5C). In contrast, in the aGVHD situations less than half of the Tregs found in the syngeneic control were observed. To better understand the relationship of Tregs with disease severity, we looked at the numbers of activated cells, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (Figure 5 D), and the Treg:Teff ratio as a more accurate indicator of T cell activity (Monteiro *et al.*, 2008). Indeed, when this ratio is considered, mice receiving Nod2^{-/-} BMDC had a higher Treg:Teff ratio than the WT BMDC group, indicating a suppressive state in the former (Figure 5E).

This phenotype, with low IFN- γ secretion, indicating lower number of Teff, together with a higher Treg:Teff ratio could be the consequence or the reason for the observed suppression after Nod2^{-/-} BMDC treatment.

The high Treg:Teff ratio could explain the results described above showing that in the intestines and livers, the histopathological scores of protected (Nod2^{-/-} BMDC) and sick mice (WT BMDC) were the same. The infiltration could correspond to a mix of effector and regulatory cells, favoring an increase in the Treg:Teff ratio and as so, favoring suppression.

NOD2^{-/-} BMDC accelerate engraftment after hematopoietic stem cell transplantation

When serum cytokines were evaluated, a huge amount of G-CSF was detected, especially in the Nod2^{-/-} BMDC receiving group (Figure 5A and B). If this was to be physiologically relevant, an impact on the hematopoiesis should be present. In fact, maturation of granulocytes in the BM of mice receiving Nod2^{-/-} BMDC, with the transplantation procedure, was improved in relation to the other groups, including the F1 control (Figure 6A). Mature segmented neutrophils were found in higher numbers in the bone marrow and peripheral blood of Nod2^{-/-} BMDC receiving group 6 days after transplantation (Figure 6A and C). On day 18, these differences were not so clear anymore (figure 6 B and C).

The data presented strongly suggest that Nod2^{-/-} BMDC induces a faster engraftment, which is mediated by the production of copious amounts of G-CSF.

DISCUSSION:

The mammalian nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptor (NLR) proteins are believed to function as intracellular sensors of invading microbes. NOD1 and NOD2 are well characterized members of the NLR family. They recognize muropeptides derived from bacterial cell wall, (Girardin, Boneca *et al.*, 2003; Travassos *et al.*, 2005) and had been shown to be involved in bacterial (Kobayashi *et al.*, 2005) as well as in other intracellular infections. (Silva *et al.*; Shaw *et al.*, 2009)

The *nod* genes had garnered much attention after the association of their polymorphism with a number of inflammatory diseases. (Werts, Girardin & Philpott, 2006) Particularly the *nod2* gene had been described as a positive modulatory element in a model of PG-induced arthritis (Rosenzweig *et al.*, 2009) and autoimmune liver injury. (Body-Malapel *et al.*, 2008) Moreover, for Chron's Disease, *nod2* polymorphism (Ogura *et al.*, 2001) in homozygosis or in compound heterozygosis had been shown to impose a 15-40 fold increase in the risk of developing disease. (Horwitz, 2007)

The importance of the intestines as target organs in GVHD had inspired studies addressing the role of *nod2* gene polymorphism in the outcome of HSCT. However, the results in human patients are quite conflicting (Elmaagacli *et al.*, 2006; Granell *et al.*, 2006; Holler *et al.*, 2006; Mayor *et al.*, 2007; Holler *et al.*, 2008; Sairafi *et al.*, 2008; Penack *et al.*, 2009; Van Der Velden *et al.*, 2009) and the experimental data in the animal model favors a protective role for NOD2 protein when present in the hematopoietic tissue of the transplanted recipient. (Penack *et al.*, 2009)

In the present work, it was also observed that when the recipient is deficient in NOD2 the incidence and severity of GVHD is augmented when compared to WT recipients in accordance to previous work. (Penack *et al.*, 2009) However, when BM and spleen cells came from Nod2 KO mice and were injected into an F1 host, protection was observed. These results are not very different from the results obtained by Penack *et al.* in a complete allogeneic or MHC congenic system (Penack *et al.*, 2009) where a tendency to protect the recipient is observed when Nod2^{-/-} BM was used as donor cells. This "tendency" could indeed reflect a protective effect from a minor population present in the hematopoietic system. The investigation toward this population led us to propose BMDC as the possible regulator.

In fact when BMDC were injected together with the transplant, they protected from aGVHD if they were deficient in Nod2. This is corroborated by the findings, in one human study, showing a complete protection from severe aGVHD when the donor carried the variants forms of NOD2 associated with Crohn's disease.(Elmaagacli *et al.*, 2006) In the present experimental model, protection was observed when survival and clinical scores were considered. However, histopathological analyses showed a quite different scenario and protection was observed for skin but not liver or colon. Although protection was accompanied by cellular infiltration, this was transitory and 5 months after transplantation there was very little mononuclear infiltration in the liver and intestines.

This finding raises two important questions: one regards the use of histopathology as a diagnostic tool. How could one explain the cellular infiltration observed in the liver and intestines of Nod2^{-/-} BMDC protected mice? One possibility could be that the "class" (or quality) of the infiltrated cells of the immune response are different between protected and non-protected mice. First, it was asked if Foxp3⁺ regulatory T cells were present in the infiltrated tissue. Since the draining node shows the same lymphoid cell composition of the drained tissue,(Monteiro *et al.*, 2008) mesenteric lymph nodes were studied. A high Treg:Teff ratio was found in the mesenteric node of the Nod2^{-/-} BMDC receiving group, what could explain, at least in part, the aGVHD inhibition and justify the mononuclear infiltrate. Shaw *et al.*(Shaw *et al.*, 2009) had shown that Nod2 contributes to IL-2 production and as so, to T cell expansion. This could explain part of the results where lower numbers of effector cells were found in the Nod2^{-/-} BMDC group. However, it is well established that Treg expansion and maintenance depends on IL-2(Almeida, Zaragoza & Freitas, 2006) and in the present case Treg numbers are not lower in the experimental group. The second question regards the mechanism of suppression, which is active at the beginning taken by the amount of infiltrating cell and the Treg:Teff ratio. At some point the infiltrate disappears implicating establishment of long lasting tolerance.

The high amounts of G-CSF found in the serum of protected mice could contribute to a faster hematopoietic recovery. In line with this, an earlier hematopoietic reconstitution is observed in mice receiving Nod2^{-/-} BMDC than in controls. In the blood, granulocyte counts are already high by day 6 after transplantation and this reflects a higher percentage of mature neutrophils in the bone marrow. By day 20, hematopoiesis is already established in both groups, although there is still a high number of progenitors in the bone marrow of the control WT BMDC group. This faster hematological reconstitution could also participate in the better outcome since it is well established the relationship between infection and aGVHD.(Cooke *et al.*, 2001; Gerbitz *et al.*, 2004) In the presence of higher numbers of granulocytes, infection control is better(Cheretakis *et al.*, 2006) and this would impact in the aGVHD outcome.

Evaluation of other cytokines shows no difference in the amount of IL-10, suggesting no involvement of Tr1 cells. However, IFN- γ , which was higher at day 6 than at day 18, was in both dates lower in the Nod2^{-/-} BMDC group than in the control. This is in accordance with reports showing the influence of NOD2 in the regulation of type 1 responses.(Shaw *et al.*, 2009) In human patients, as well as in the experimental model, the participation of IFN- γ in aGVHD is unequivocal, although the exact role of this cytokine is not completely clear.(Velardi *et al.*, 1989; Welniak *et al.*, 2000) It is known that the complete absence of the cytokine in the donor T cell compartment increases disease severity,(Welniak *et al.*, 2000) but neutralization with monoclonal antibodies, on the contrary, inhibits

disease.(Mowat, 1989) In the case shown here, there is some diminution on the levels of IFN- γ in the Nod2^{-/-} BMDC receiving group, which could contribute to a less severe disease.

Polymorphisms of the *nod2* gene associated with inflammatory bowel disease had been described as gain and loss of function,(Kobayashi *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2005) making unclear the function of the molecule and its different portions. However, lately, a couple of reports came out establishing a role for NOD2 in regulating type 1 responses to infections(Shaw *et al.*, 2009) and contributing to inflammatory diseases.(Werts, Girardin & Philpott, 2006; Rosenzweig *et al.*, 2009) This regulatory role had been shown to be exerted directly in the T cell without any influence of the Nod2 deficient APC,(Shaw *et al.*, 2009) whose antigen presenting capability is intact when compared to WT APC.

In the present report it seems clear that very discrete differences between WT and Nod2^{-/-} BMDC account for the whole difference in the post-transplant phenotype observed. No important differences were observed in terms of BMDC phenotypes or cytokine secretion *in vitro*. Also, the ability of Nod2^{-/-} DCs to stimulate allogeneic T cells is not lower than that of WT DCs (data not shown). One possibility would be the presence of a non-defined “less-mature DCs” which could account for some of the observed phenomena: 1) Treg generation; 2) faster engraftment; and 3) less effectors. Tregs are known to be induced with incomplete stimulation conditions(Steinman, Hawiger & Nussenzweig, 2003) and the increased ratio favoring Tregs could be dependent on the lack of full co-stimulation in a self-MHC restricted manner. It is known that “normal” hematopoiesis depends on T cell help and T cell can positively influence granulopoiesis after antigen recognition.(Monteiro *et al.*, 2005) However, the amount and quality of the stimulatory signal is not known and could well be less rigorous than necessary to a naïve T cell. Generation of effectors in the presence of *nod2* deletion is less efficient(Shaw *et al.*, 2009) and this efficiency could be determined by the availability of stimulatory signals.

The nature of the signaling events involved in the phenotype observed is not yet understood.

In conclusion, Nod2 deficient BMDC can protect from aGVHD. This protection is accompanied by a limitation in the number of Teff, increase in the Treg:Teff ratio and faster engraftment. These findings open a new possibility of understanding the central involvement of NOD2 in signaling T cell response, placing the NOD2 molecule as a promising target for novel therapeutic interventions.

Acknowledgments

We thank Carlos Aurélio de Oliveira for his kind support in irradiating mice. We also thank Professor W. Savino for help with the histology and manuscript preparation

Authorship Contributions

Ramon Lemos: designed and performed research, analyzed data and wrote the paper
Rômulo B. Areal: designed and performed research, analyzed data and wrote the paper
Rômulo G. Galvani: designed and performed research, analyzed data and wrote the paper
Ana Paula G. Alves: performed research, analyzed data
Pollyanna A. Salvador: performed research, analyzed data
João Paulo Monteiro: analyzed data
Dario S. Zamboni: designed research, analyzed data and wrote the paper
Adriana Bonomo: designed research, analyzed data and wrote the paper

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare no conflict of interest

References

- ABDUL-HAI, A., L. WEISS, S. SLAVIN & R. OR. **Improved survival following induction of GVHD following lipopolysaccharide immunization.** *Exp Hematol*, 34(4), 549-53. 2006.
- AKIRA, S. & K. TAKEDA. **Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol*, 4(7), 499-511. 2004.
- AKIRA, S., S. UEMATSU & O. TAKEUCHI. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, 124(4), 783-801. 2006.
- ALMEIDA, A. R., N. LEGRAND, M. PAPIERNIK & A. A. FREITAS. **Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers.** *J Immunol*, 169(9), 4850-60. 2002.
- ALMEIDA, A. R., B. ZARAGOZA & A. A. FREITAS. **Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells.** *J Immunol*, 177(1), 192-200. 2006.
- ANDERSON, B. E., J. M. MCNIFF, D. JAIN, B. R. BLAZAR, W. D. SHLOMCHIK & M. J. SHLOMCHIK. **Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells**

and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood*, 105(5), 2227-34. 2005.

BARNICH, N., T. HISAMATSU, J. E. AGUIRRE, R. XAVIER, H. C. REINECKER & D. K. PODOLSKY. **GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells.** *J Biol Chem*, 280(19), 19021-6. 2005.

BARON, F., R. STORB & M. T. LITTLE. **Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress.** *Arch Med Res*, 34(6), 528-44. 2003.

BARREAU, F., U. MEINZER, F. CHAREYRE, D. BERREBI, M. NIWA-KAWAKITA, M. DUSSAILLANT, B. FOLIGNE, V. OLLENDORFF, M. HEYMAN, S. BONACORSI, T. LESUFFLEUR, G. STERKERS, M. GIOVANNINI & J. P. HUGOT. **CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice.** *PLoS One*, 2(6), e523. 2007.

BEELEN, D. W., A. ELMAAGACLI, K. D. MULLER, H. HIRCHE & U. W. SCHAEFER. **Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial.** *Blood*, 93(10), 3267-75. 1999.

BEILHACK, A., S. SCHULZ, J. BAKER, G. F. BEILHACK, C. B. WIELAND, E. I. HERMAN, E. M. BAKER, Y. A. CAO, C. H. CONTAG & R. S. NEGRIN. **In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets.** *Blood*, 106(3), 1113-22. 2005.

BILLINGHAM, R. E. **The biology of graft-versus-host reactions.** *Harvey Lect*, 62, 21-78. 1966.

BISWAS, S. K. & E. LOPEZ-COLLAZO. **Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance.** *Trends Immunol*, 30(10), 475-87. 2009.

BJORKLUND, A., J. ASCHAN, M. LABOPIN, M. REMBERGER, O. RINGDEN, J. WINIARSKI & P. LJUNGMAN. **Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant*, 40(11), 1055-62. 2007.

BODY-MALAPEL, M., S. DHARANCY, D. BERREBI, A. LOUVET, J. P. HUGOT, D. J. PHILPOTT, M. GIOVANNINI, F. CHAREYRE, G. PAGES, E. GANTIER, S. E. GIRARDIN, I. GARCIA, S. HUDAULT, F. CONTI, P. J. SANSONETTI, M. CHAMAILLARD, P. DESREUMAUX, L. DUBUQUOY & P. MATHURIN. **NOD2: a potential target for regulating liver injury.** *Lab Invest*, 88(3), 318-27. 2008.

BONECA, I. G. **The role of peptidoglycan in pathogenesis.** *Curr Opin Microbiol*, 8(1), 46-53. 2005.

BROK, H. P., P. J. HEIDT, P. H. VAN DER MEIDE, C. ZURCHER & J. M. VOSSEN. **Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice.** J Immunol, 151(11), 6451-9. 1993.

BROXMEYER, H. E. F. O. S. **Cord blood stem cell transplantation.** in: Hematopoietic cell transplantation. K. G. B. E.D. Thomas, and S.J. Forman, London, Blackwell Science, 1999.

CALCATERRA, C., L. SFONDRINI, A. ROSSINI, M. SOMMARIVA, C. RUMIO, S. MENARD & A. BALSARI. **Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease.** J Immunol, 181(9), 6132-9. 2008.

CHAMAILLARD, M., M. HASHIMOTO, Y. HORIE, J. MASUMOTO, S. QIU, L. SAAB, Y. OGURA, A. KAWASAKI, K. FUKASE, S. KUSUMOTO, M. A. VALVANO, S. J. FOSTER, T. W. MAK, G. NUNEZ & N. INOHARA. **An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid.** Nat Immunol, 4(7), 702-7. 2003.

CHAO, N. J., S.G. EMERSON, K.I. WEINBERG. **Stem cell transplantation (cordblood transplants).** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004.

CHERETAKIS, C., R. LEUNG, C. X. SUN, Y. DROR & M. GLOGAUER. **Timing of neutrophil tissue repopulation predicts restoration of innate immune protection in a murine bone marrow transplantation model.** Blood, 108(8), 2821-6. 2006.

COOK, D. N., D. S. PISETSKY & D. A. SCHWARTZ. **Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease.** Nat Immunol, 5(10), 975-9. 2004.

COOKE, K. R., A. GERBITZ, J. M. CRAWFORD, T. TESHIMA, G. R. HILL, A. TESOLIN, D. P. ROSSIGNOL & J. L. FERRARA. **LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation.** J Clin Invest, 107(12), 1581-9. 2001.

COOKE, K. R., G. R. HILL, J. M. CRAWFORD, D. BUNGARD, Y. S. BRINSON, J. DELMONTE, JR. & J. L. FERRARA. **Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease.** J Clin Invest, 102(10), 1882-91. 1998.

COOKE, K. R., L. KOBZIK, T. R. MARTIN, J. BREWER, J. DELMONTE, JR., J. M. CRAWFORD & J. L. FERRARA. **An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin.** Blood, 88(8), 3230-9. 1996.

COOKE, K. R., K. OLKIEWICZ, N. ERICKSON & J. L. FERRARA. **The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease.** J Endotoxin Res, 8(6), 441-8. 2002.

DAMIANO, J. S., V. OLIVEIRA, K. WELSH & J. C. REED. **Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses.** *Biochem J*, 381(Pt 1), 213-9. 2004.

ELMAAGACLI, A. H., M. KOLDEHOFF & D. W. BEELEN. **Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9.** *Bone Marrow Transplant*, 44(5), 295-302. 2009.

ELMAAGACLI, A. H., M. KOLDEHOFF, H. HINDAHL, N. K. STECKEL, R. TRENSCHEL, R. PECENY, H. OTTINGER, P. M. RATH, R. S. ROSS, M. ROGGENDORF, H. GROSSE-WILDE & D. W. BEELEN. **Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation.** *Transplantation*, 81(2), 247-54. 2006.

FERRARA, J., F. J. GUILLEN, B. SLECKMAN, S. J. BURAKOFF & G. F. MURPHY. **Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease.** *J Invest Dermatol*, 86(4), 371-5. 1986.

FERRARA, J. L. **The cytokine modulation of acute graft-versus-host disease.** *Bone Marrow Transplant*, 21 Suppl 3, S13-5. 1998.

FLANAGAN, D. L., R. GROSS, C. D. JENNINGS, B. E. CAYWOOD, S. GOES, A. M. KAPLAN & J. S. BRYSON. **Induction of syngeneic graft-versus-host disease in LPS hyporesponsive C3H/HeJ mice.** *J Leukoc Biol*, 70(6), 873-80. 2001.

FOLIGNE, B., G. ZOUMPOPOULOU, J. DEWULF, A. BEN YOUNES, F. CHAREYRE, J. C. SIRARD, B. POT & C. GRANGETTE. **A key role of dendritic cells in probiotic functionality.** *PLoS One*, 2(3), e313. 2007.

FRITZ, J. H., L. LE BOURHIS, G. SELLGE, J. G. MAGALHAES, H. FSIHI, T. A. KUFER, C. COLLINS, J. VIALA, R. L. FERRERO, S. E. GIRARDIN & D. J. PHILPOTT. **Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity.** *Immunity*, 26(4), 445-59. 2007.

GERBITZ, A., M. SCHULTZ, A. WILKE, H. J. LINDE, J. SCHOLMERICH, R. ANDREESSEN & E. HOLLER. **Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt.** *Blood*, 103(11), 4365-7. 2004.

GIRARDIN, S. E., I. G. BONECA, J. VIALA, M. CHAMAILLARD, A. LABIGNE, G. THOMAS, D. J. PHILPOTT & P. J. SANSONETTI. **Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.** *J Biol Chem*, 278(11), 8869-72. 2003.

GIRARDIN, S. E., R. TOURNEBIZE, M. MAVRIS, A. L. PAGE, X. LI, G. R. STARK, J. BERTIN, P. S. DISTEFANO, M. YANIV, P. J. SANSONETTI & D. J. PHILPOTT. **CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri.** EMBO Rep, 2(8), 736-42. 2001.

GIRARDIN, S. E., L. H. TRAVASSOS, M. HERVE, D. BLANOT, I. G. BONECA, D. J. PHILPOTT, P. J. SANSONETTI & D. MENGIN-LECREULX. **Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2.** J Biol Chem, 278(43), 41702-8. 2003.

GLASS, B., L. UHAREK, G. HARTUNG, M. ZEIS, J. STEINMANN, P. DREGER, M. KRONKE & N. SCHMITZ. **Immunotherapeutic aspects of allogeneic peripheral progenitor cells.** Bone Marrow Transplant, 21 Suppl 3, S3-8. 1998.

GRANELL, M., A. URBANO-ISPIZUA, J. I. AROSTEGUI, F. FERNANDEZ-AVILES, C. MARTINEZ, M. ROVIRA, J. RIUS, S. PLAZA, A. GAYA, A. NAVARRO, C. TALARN, E. CARRERAS, M. MONZO, E. MONTSERRAT & J. YAGUE. **Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation.** Haematologica, 91(10), 1372-6. 2006.

GRATAMA, J. W., J. KRAAN, W. LEVERING, D. R. VAN BOCKSTAELE, G. T. RIJKERS & C. E. VAN DER SCHOOT. **Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study.** Cytometry, 30(3), 109-17. 1997.

GRATWOHL, A. **Principles of conditioning regimens, in Hematopoietic stem cell Transplantation.** Paris, Institut de Recherche sur les Leucémies et les Maladies du Sang, 2004.

GRUHN, B., J. INTEK, N. PFAFFENDORF, R. ZELL, S. CORBACIOGLU, F. ZINTL, J. F. BECK, K. M. DEBATIN & D. STEINBACH. **Polymorphism of interleukin-23 receptor gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children.** Biol Blood Marrow Transplant, 15(12), 1571-7. 2009.

HART, D. P. & K. S. PEGGS. **Current status of allogeneic stem cell transplantation for treatment of hematologic malignancies.** Clin Pharmacol Ther, 82(3), 325-9. 2007.

HILL, G. R., K. R. COOKE, T. TESHIMA, J. M. CRAWFORD, J. C. KEITH, JR., Y. S. BRINSON, D. BUNGARD & J. L. FERRARA. **Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation.** J Clin Invest, 102(1), 115-23. 1998.

HILL, G. R., J. M. CRAWFORD, K. R. COOKE, Y. S. BRINSON, L. PAN & J. L. FERRARA. **Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines.** Blood, 90(8), 3204-13. 1997.

HOLLER, E., G. ROGLER, J. BRENMOEHL, J. HAHN, H. GREINIX, A. M. DICKINSON, G. SOCIE, D. WOLFF, J. FINKE, G. FISCHER, G. JACKSON, V. ROCHA, I. HILGENDORF, G. EISSNER, J. MARIENHAGEN & R. ANDREESEN. **The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation.** *Int J Immunogenet*, 35(4-5), 381-4. 2008.

HOLLER, E., G. ROGLER, J. BRENMOEHL, J. HAHN, H. HERFARTH, H. GREINIX, A. M. DICKINSON, G. SOCIE, D. WOLFF, G. FISCHER, G. JACKSON, V. ROCHA, B. STEINER, G. EISSNER, J. MARIENHAGEN, J. SCHOELMERICH & R. ANDREESEN. **Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination.** *Blood*, 107(10), 4189-93. 2006.

HOLLER, E., G. ROGLER, H. HERFARTH, J. BRENMOEHL, P. J. WILD, J. HAHN, G. EISSNER, J. SCHOELMERICH & R. ANDREESEN. **Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation.** *Blood*, 104(3), 889-94. 2004.

HOROWITZ, M. M., R. P. GALE, P. M. SONDEL, J. M. GOLDMAN, J. KERSEY, H. J. KOLB, A. A. RIMM, O. RINGDEN, C. ROZMAN, B. SPECK & ET AL. **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** *Blood*, 75(3), 555-62. 1990.

HOROWITZ, B. H. **The straw that stirs the drink: insight into the pathogenesis of inflammatory bowel disease revealed through the study of microflora-induced inflammation in genetically modified mice.** *Inflamm Bowel Dis*, 13(4), 490-500. 2007.

INOHARA, N., T. KOSEKI, L. DEL PESO, Y. HU, C. YEE, S. CHEN, R. CARRIO, J. MERINO, D. LIU, J. NI & G. NUNEZ. **Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB.** *J Biol Chem*, 274(21), 14560-7. 1999.

INOHARA, N., Y. OGURA, A. FONTALBA, O. GUTIERREZ, F. PONS, J. CRESPO, K. FUKASE, S. INAMURA, S. KUSUMOTO, M. HASHIMOTO, S. J. FOSTER, A. P. MORAN, J. L. FERNANDEZ-LUNA & G. NUNEZ. **Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.** *J Biol Chem*, 278(8), 5509-12. 2003.

JANEWAY, C. A., P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.** Artmed, Porto Alegre, 2002.

JASPERSON, L. K., C. BUCHER, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, A. L. MELLOR, D. H. MUNN & B. R. BLAZAR. **Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality.** *Blood*, 114(24), 5062-70. 2009.

- KAISHO, T. & S. AKIRA. **Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice.** Trends Immunol, 22(2), 78-83. 2001.
- KAWAI, T. & S. AKIRA. **TLR signaling.** Semin Immunol, 19(1), 24-32. 2007.
- KOBAYASHI, K., N. INOHARA, L. D. HERNANDEZ, J. E. GALAN, G. NUNEZ, C. A. JANEWAY, R. MEDZHITOV & R. A. FLAVELL. **RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems.** Nature, 416(6877), 194-9. 2002.
- KOBAYASHI, K. S., M. CHAMAILLARD, Y. OGURA, O. HENEGARIU, N. INOHARA, G. NUNEZ & R. A. FLAVELL. **Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.** Science, 307(5710), 731-4. 2005.
- KOMAI-KOMA, M., L. JONES, G. S. OGG, D. XU & F. Y. LIEW. **TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor.** Proc Natl Acad Sci U S A, 101(9), 3029-34. 2004.
- KORNGOLD, R. & J. SPRENT. **Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow.** J Exp Med, 148(6), 1687-98. 1978.
- LESAGE, S., H. ZOUALI, J. P. CEZARD, J. F. COLOMBEL, J. BELAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. O'MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, R. MODIGLIANI, C. GOWER-ROUSSEAU, J. MACRY, F. MERLIN, M. CHAMAILLARD, A. S. JANNOT, G. THOMAS & J. P. HUGOT. **CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.** Am J Hum Genet, 70(4), 845-57. 2002.
- LISTER, J., J. F. GRYN, K. L. MCQUEEN, D. T. HARRIS, J. M. ROSSETTI & R. K. SHADDUCK. **Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy.** Stem Cells Dev, 16(1), 177-86. 2007.
- LORENZ, E., D. A. SCHWARTZ, P. J. MARTIN, T. GOOLEY, M. T. LIN, J. W. CHIEN, J. A. HANSEN & J. G. CLARK. **Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation.** Biol Blood Marrow Transplant, 7(7), 384-7. 2001.
- MAEDA, S., L. C. HSU, H. LIU, L. A. BANKSTON, M. IIMURA, M. F. KAGNOFF, L. ECKMANN & M. KARIN. **Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing.** Science, 307(5710), 734-8. 2005.
- MARANINCHI, D., E. GLUCKMAN, D. BLAISE, D. GUYOTAT, B. RIO, J. L. PICO, V. LEBLOND, M. MICHALLET, F. DREYFUS, N. IFRAH & ET AL. **Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias.** Lancet, 2(8552), 175-8. 1987.

MARTINON, F. & J. TSCHOPP. **Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases.** *Cell*, 117(5), 561-74. 2004.

MAYOR, N. P., B. E. SHAW, D. A. HUGHES, H. MALDONADO-TORRES, J. A. MADRIGAL, S. KESHAV & S. G. MARSH. **Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors.** *J Clin Oncol*, 25(27), 4262-9. 2007.

MEDZHITOV, R., P. PRESTON-HURLBURT & C. A. JANEWAY, JR. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature*, 388(6640), 394-7. 1997.

MENDEZ-OTERO, R., G. R. DE FREITAS, C. ANDRE, M. L. DE MENDONCA, M. FRIEDRICH & J. OLIVEIRA-FILHO. **Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy.** *Regen Med*, 2(4), 417-23. 2007.

MICKELSON, E. E. W., PETERSDORF. **Histocompatibility, in Hematopoietic cell transplantation.** K. G. B. E.D. Thomas, and S.J. Forman, London, Blackwell Science, 1999.

MIMEAULT, M., R. HAUKE & S. K. BATRA. **Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies.** *Clin Pharmacol Ther*, 82(3), 252-64. 2007.

MONTEIRO, J. P., A. BENJAMIN, E. S. COSTA, M. A. BARCINSKI & A. BONOMO. **Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells.** *Blood*, 105(4), 1484-91. 2005.

MONTEIRO, J. P., J. FARACHE, A. C. MERCADANTE, J. A. MIGNACO, M. BONAMINO & A. BONOMO. **Pathogenic effector T cell enrichment overcomes regulatory T cell control and generates autoimmune gastritis.** *J Immunol*, 181(9), 5895-903. 2008.

MOWAT, A. M. **Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction.** *Immunology*, 68(1), 18-23. 1989.

MURAI, M., H. YONEYAMA, T. EZAKI, M. SUEMATSU, Y. TERASHIMA, A. HARADA, H. HAMADA, H. ASAKURA, H. ISHIKAWA & K. MATSUSHIMA. **Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.** *Nat Immunol*, 4(2), 154-60. 2003.

NERVI, B., D. C. LINK & J. F. DIPERSIO. **Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization.** *J Cell Biochem*, 99(3), 690-705. 2006.

O'RIORDAN, M., C. H. YI, R. GONZALES, K. D. LEE & D. A. PORTNOY. **Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway.** Proc Natl Acad Sci U S A, 99(21), 13861-6. 2002.

OGURA, Y., D. K. BONEN, N. INOHARA, D. L. NICOLAE, F. F. CHEN, R. RAMOS, H. BRITTON, T. MORAN, R. KARALIUSKAS, R. H. DUERR, J. P. ACHKAR, S. R. BRANT, T. M. BAYLESS, B. S. KIRSCHNER, S. B. HANAUER, G. NUNEZ & J. H. CHO. **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.** Nature, 411(6837), 603-6. 2001.

PENACK, O., E. HOLLER & M. R. VAN DEN BRINK. **Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors.** Blood, 115(10), 1865-72.

PENACK, O., O. M. SMITH, A. CUNNINGHAM-BUSSEL, X. LIU, U. RAO, N. YIM, I. K. NA, A. M. HOLLAND, A. GHOSH, S. X. LU, R. R. JENQ, C. LIU, G. F. MURPHY, K. BRANDL & M. R. VAN DEN BRINK. **NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease.** J Exp Med, 206(10), 2101-10. 2009.

PHILPOTT, D. J., S. YAMAOKA, A. ISRAEL & P. J. SANSONETTI. **Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells.** J Immunol, 165(2), 903-14. 2000.

QUESENBERRY, P. J., G. COLVIN & M. ABEDI. **Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond.** Exp Hematol, 33(1), 9-19. 2005.

RAKOFF-NAHOUM, S., J. PAGLINO, F. ESLAMI-VARZANEH, S. EDBERG & R. MEDZHITOV. **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** Cell, 118(2), 229-41. 2004.

REDDY, P. & J. L. FERRARA. **Immunobiology of acute graft-versus-host disease.** Blood Rev, 17(4), 187-94. 2003.

ROSENZWEIG, H. L., M. M. JANN, T. T. GLANT, T. M. MARTIN, S. R. PLANCK, W. VAN EDEN, P. J. VAN KOOTEN, R. A. FLAVELL, K. S. KOBAYASHI, J. T. ROSENBAUM & M. P. DAVEY. **Activation of nucleotide oligomerization domain 2 exacerbates a murine model of proteoglycan-induced arthritis.** J Leukoc Biol, 85(4), 711-8. 2009.

SAIRAFI, D., M. UZUNEL, M. REMBERGER, O. RINGDEN & J. MATTSSON. **No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT.** Bone Marrow Transplant, 41(11), 961-4. 2008.

SAMUEL, G. N., I. H. KERRIDGE, M. VOWELS, A. TRICKETT, J. CHAPMAN & T. DOBBINS. **Ethnicity, equity and public benefit: a critical evaluation of public**

umbilical cord blood banking in Australia. Bone Marrow Transplant, 40(8), 729-34. 2007.

SHAW, M. H., T. REIMER, C. SANCHEZ-VALDEPENAS, N. WARNER, Y. G. KIM, M. FRESNO & G. NUNEZ. **T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to Toxoplasma gondii.** Nat Immunol, 10(12), 1267-74. 2009.

SHLOMCHIK, W. D., M. S. COUZENS, C. B. TANG, J. MCNIFF, M. E. ROBERT, J. LIU, M. J. SHLOMCHIK & S. G. EMERSON. **Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells.** Science, 285(5426), 412-5. 1999.

SILVA, G. K., F. R. GUTIERREZ, P. M. GUEDES, C. V. HORTA, L. D. CUNHA, T. W. MINEO, J. SANTIAGO-SILVA, K. S. KOBAYASHI, R. A. FLAVELL, J. S. SILVA & D. S. ZAMBONI. **Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection.** J Immunol, 184(3), 1148-52.

STEINMAN, R. M., D. HAWIGER & M. C. NUSSENZWEIG. **Tolerogenic dendritic cells.** Annu Rev Immunol, 21, 685-711. 2003.

STORB, R., R. L. PRENTICE, C. D. BUCKNER, R. A. CLIFT, F. APPELBAUM, J. DEEG, K. DONEY, J. A. HANSEN, M. MASON, J. E. SANDERS, J. SINGER, K. M. SULLIVAN, R. P. WITHERSPOON & E. D. THOMAS. **Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment.** N Engl J Med, 308(6), 302-7. 1983.

STROBER, W., P. J. MURRAY, A. KITANI & T. WATANABE. **Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2.** Nat Rev Immunol, 6(1), 9-20. 2006.

TAKATSUKA, H., T. IWASAKI, T. OKAMOTO & E. KAKISHITA. **Intestinal graft-versus-host disease: mechanisms and management.** Drugs, 63(1), 1-15. 2003.

TAYLOR, P. A., M. J. EHRHARDT, C. J. LEES, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, A. M. KRIEG, A. H. SHARPE, W. J. MURPHY, J. S. SERODY, H. HEMMI, S. AKIRA, R. B. LEVY & B. R. BLAZAR. **TLR agonists regulate alloresponses and uncover a critical role for donor APCs in allogeneic bone marrow rejection.** Blood, 112(8), 3508-16. 2008.

TIERCY, J. M., M. BUJAN-LOSE, B. CHAPUIS, A. GRATWOHL, J. GMUR, R. SEGER, M. KERN, A. MORELL & E. ROOSNEK. **Bone marrow transplantation with unrelated donors: what is the probability of identifying an HLA-A/B/Cw/DRB1/B3/B5/DQB1-matched donor?** Bone Marrow Transplant, 26(4), 437-41. 2000.

TRAVASSOS, L. H., L. A. CARNEIRO, S. E. GIRARDIN, I. G. BONECA, R. LEMOS, M. T. BOZZA, R. C. DOMINGUES, A. J. COYLE, J. BERTIN, D. J. PHILPOTT & M. C.

- PLOTKOWSKI. **Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa***. J Biol Chem, 280(44), 36714-8. 2005.
- TRINCHIERI, G. &A. SHER. **Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence**. Nat Rev Immunol, 7(3), 179-90. 2007.
- UEHARA, A., Y. FUJIMOTO, A. KAWASAKI, S. KUSUMOTO, K. FUKASE &H. TAKADA. **Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1**. J Immunol, 177(3), 1796-804. 2006.
- VAN BEELEN, A. J., Z. ZELINKOVA, E. W. TAANMAN-KUETER, F. J. MULLER, D. W. HOMMES, S. A. ZAAT, M. L. KAPSENBERG &E. C. DE JONG. **Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells**. Immunity, 27(4), 660-9. 2007.
- VAN BEKKUM, D. W. &S. KNAAN. **Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction**. J Natl Cancer Inst, 58(3), 787-90. 1977.
- VAN BEKKUM, D. W., J. ROODENBURG, P. J. HEIDT &D. VAN DER WAAIJ. **Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora**. J Natl Cancer Inst, 52(2), 401-4. 1974.
- VAN DEN BRINK, M. R., E. MOORE, K. J. HORNDASCH, J. M. CRAWFORD, J. HOFFMAN, G. F. MURPHY &S. J. BURAKOFF. **Fas-deficient lpr mice are more susceptible to graft-versus-host disease**. J Immunol, 164(1), 469-80. 2000.
- VAN DER VELDEN, W. J., N. M. BLIJLEVENS, F. M. MAAS, N. P. SCHAAP, J. H. JANSEN, B. A. VAN DER REIJDEN, T. FEUTH, H. DOLSTRA &J. P. DONNELLY. **NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted haematopoietic stem cell transplantation**. Bone Marrow Transplant, 44(4), 243-8. 2009.
- VELARDI, A., P. VARESE, A. TERENCE, C. DEMBECH, N. ALBI, C. E. GROSSI, L. MORETTA, M. F. MARTELLI, F. GRIGNANI &M. C. MINGARI. **Lymphokine production by T-cell clones after human bone marrow transplantation**. Blood, 74(5), 1665-72. 1989.
- VOSSEN, J. M., P. J. HEIDT, H. VAN DEN BERG, E. J. GERRITSEN, J. HERMANS &L. J. DOOREN. **Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 9(1), 14-23. 1990.
- WATANABE, T., A. KITANI, P. J. MURRAY &W. STROBER. **NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses**. Nat Immunol, 5(8), 800-8. 2004.

WELNIAK, L. A., B. R. BLAZAR, M. R. ANVER, R. H. WILTROUT & W. J. MURPHY. **Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning.** Biol Blood Marrow Transplant, 6(6), 604-12. 2000.

WELNIAK, L. A., B. R. BLAZAR & W. J. MURPHY. **Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** Annu Rev Immunol, 25, 139-70. 2007.

WERTS, C., S. E. GIRARDIN & D. J. PHILPOTT. **TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad.** Cell Death Differ, 13(5), 798-815. 2006.

Figures

Figure 1

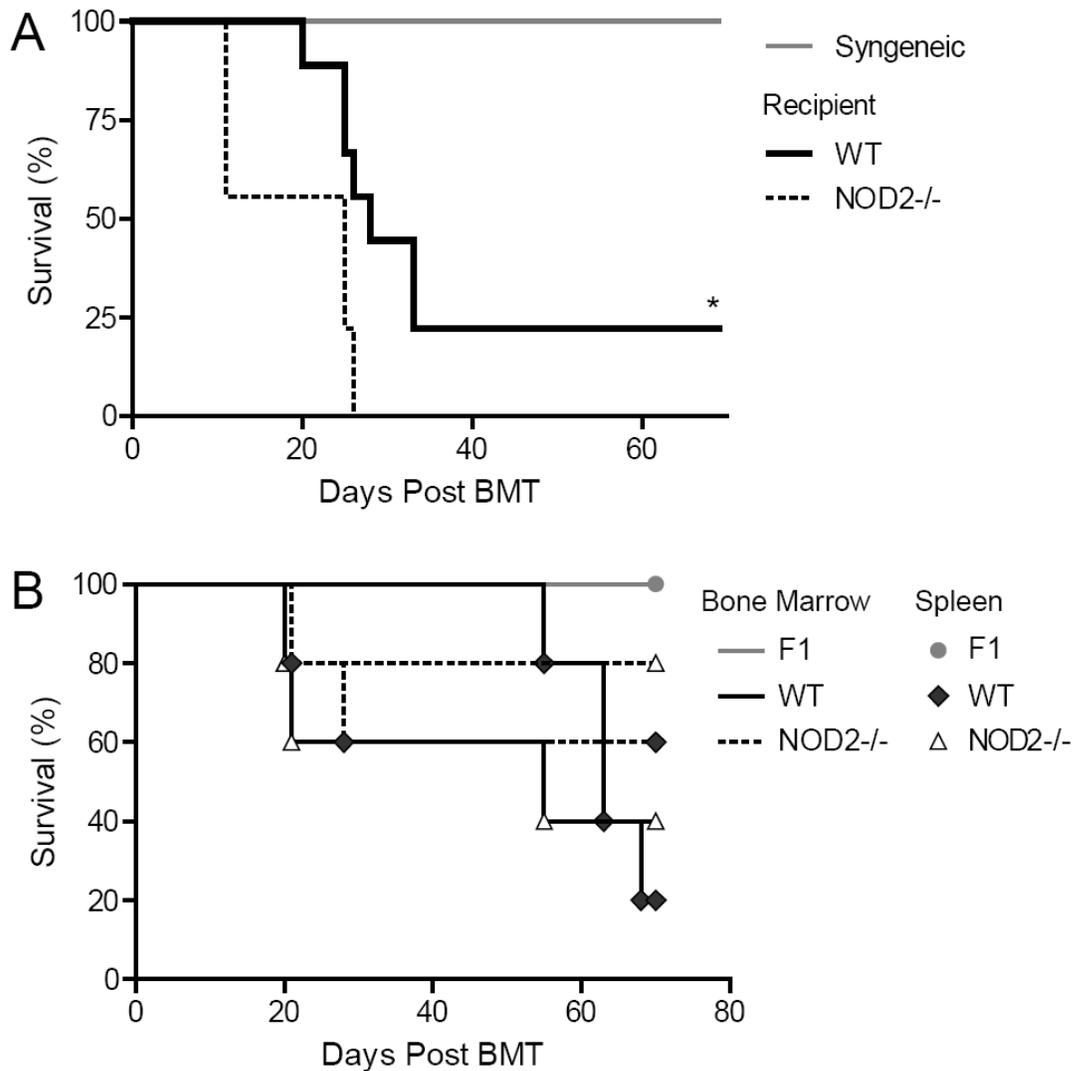


Figure 1. Donor NOD2^{-/-} myeloid cells protects from GVHD lethality. (A) Lethally irradiated B6 WT or B6 Nod2^{-/-} mice received 5×10^6 BM and purified T cells from BALB/c mice. Syngeneic controls were B6 WT receiving B6 WT cells. Percentages of surviving animals is shown. * indicate $P < .05$ for log rank test between WT and Nod2^{-/-}. (B) F1 (C57BL/6 \times BALB/c) mice were lethally irradiated and received T-cell depleted BM (5×10^6) along with splenocytes (corrected to 5×10^6 CD3⁺) derived from B6 WT or B6 Nod2^{-/-} as indicated in the figure. Percent of surviving animals. Log rank: $P < .05$ between Nod2^{-/-} BM+Spl. and WT BM+Spl.; $P < .05$ between Nod2^{-/-} BM+WT Spl. and WT BM+Spl.; $P > .05$ between WT BM+Nod2^{-/-} Spl. and WT BM+Spl. Experiment representative of 3 in A and of 2 in B, n=5 to 8 animals per group.

Figure 2

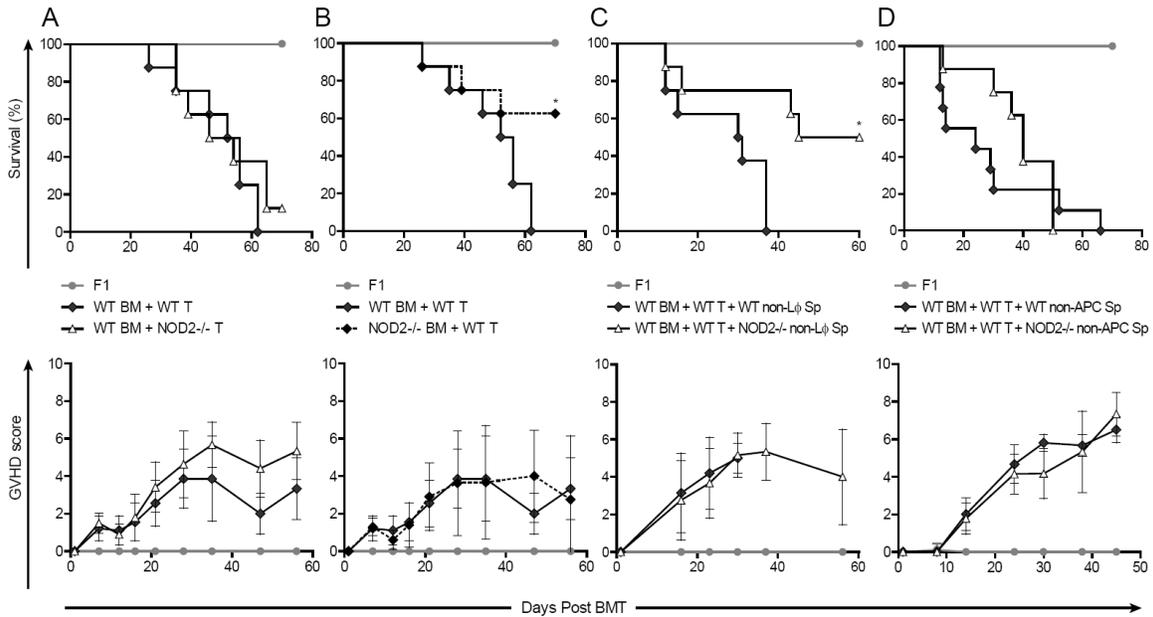


Figure 2. NOD2^{-/-} non-T, non-B, non-NK spleen cells protects from GVHD lethality. (A) F1 mice (C57BL/6 x BALB/c) were lethally irradiated and received B6 WT T-cell depleted BM along with B6 WT or B6 Nod2^{-/-} lymph node purified T cells (5x10⁶). (B) F1 mice were lethally irradiated and received B6 WT or B6 Nod2^{-/-} T-cell depleted BM (5x10⁶) along with B6 WT lymph node purified T cells (5x10⁶). (C) B6 WT or B6 Nod2^{-/-} non-T, non-B and non-NK spleen cells (2x10⁶) along with B6 WT BM (5x10⁶) and purified T cells (5x10⁶) were given to lethally irradiated F1 mice. (D) B6 WT or B6 Nod2^{-/-} non-CD11b,-CD11c,-CD4,-CD8 spleen cells (1,2x10⁷) along with B6 WT BM (5x10⁶) and purified T cells (5x10⁶) were given to lethally irradiated F1 mice. Top panels show survival rates and bottom panels show clinical scores. * indicate P < .05 for log rank test between B6 WT and B6 Nod2^{-/-} groups. One experiment representative of 2, n=8 animals per group.

Figure 3

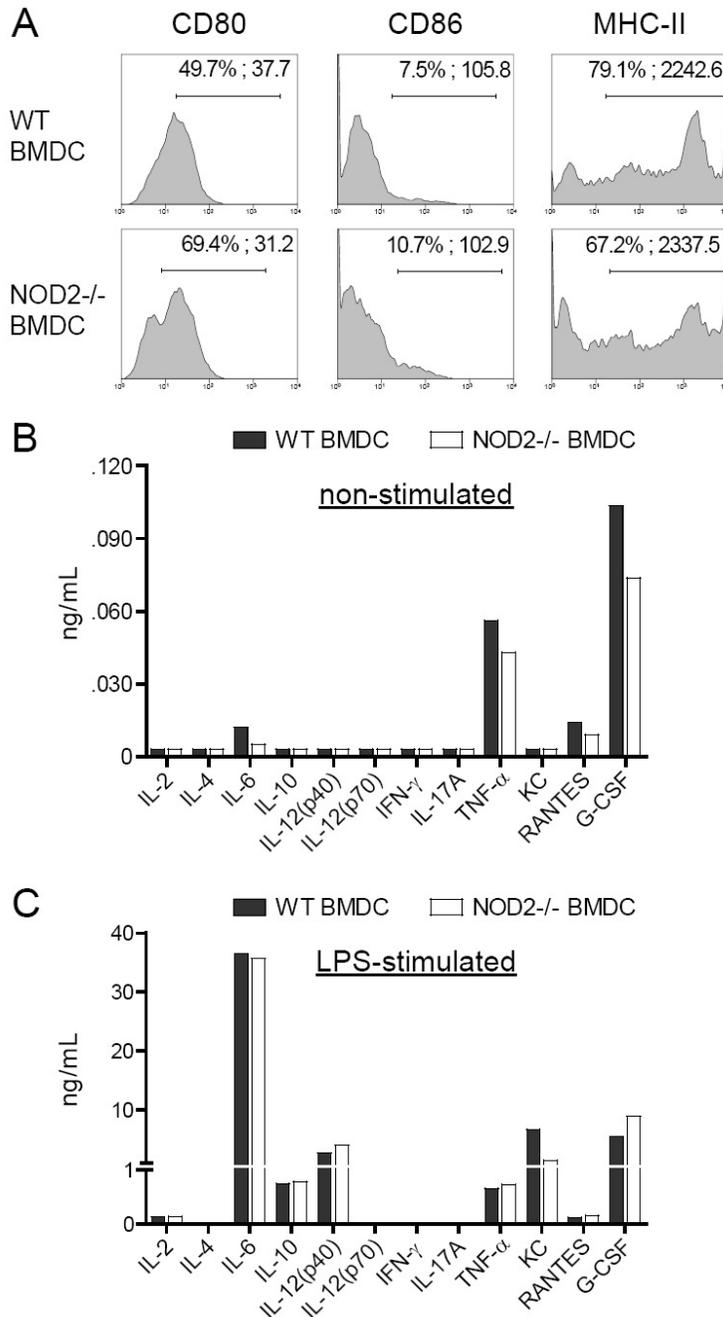


Figure 3. WT and NOD2^{-/-} BMDC have similar *in vitro* phenotype. (A) Expression of CD80, CD86 and MHC-II in BMDC from B6 WT or B6 Nod2^{-/-} mice. Percentage of positive cells and mean fluorescence (MFI) are shown. Cytokine production of (B) resting or (C) 1ug/mL LPS-stimulated B6 WT or B6 Nod2^{-/-} BMDC. Data of one experiment representative of 2.

Figure 4

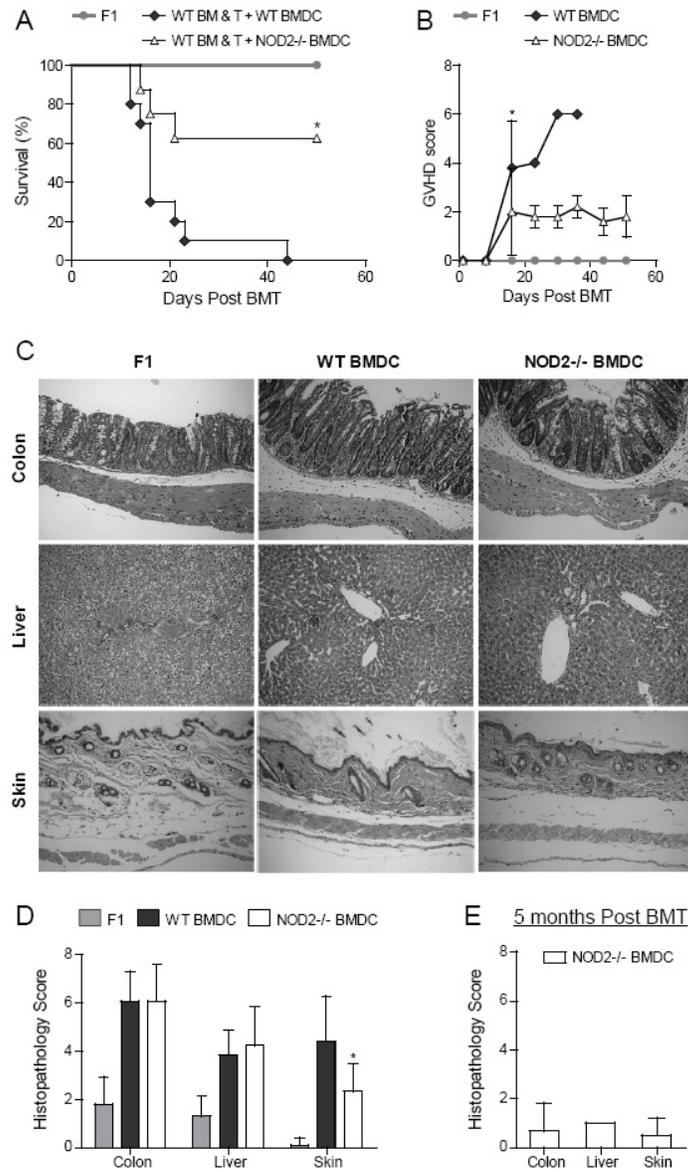


Figure 4. NOD2 deficient DCs impairs aGVHD mortality. F1 mice were lethally irradiated and received B6 WT BM (5×10^6) and B6 WT purified T cells (5×10^6), along with B6 WT or B6 Nod2^{-/-} BMDC (1×10^6). Syngeneic control was F1 animals receiving F1 cells. (A) Percent of surviving animals and (B) Total GVHD clinical scores. * indicate $P < .05$ between WT and Nod2^{-/-} BMDC groups. (C) Histopathology of colon, liver and skin of animals after 18 days of transplantation. (D) Average histopathology scores at 18 days post transplantation of pooled mice from 3 experiments. (E) Histopathology of Nod2^{-/-} BMDC group mice 5 months post transplantation. * indicate $P < .05$. Data of one experiment representative of 3 for A, B, C and E and mean of 3 experiments for D; n=8 animals per group.

Figure 5

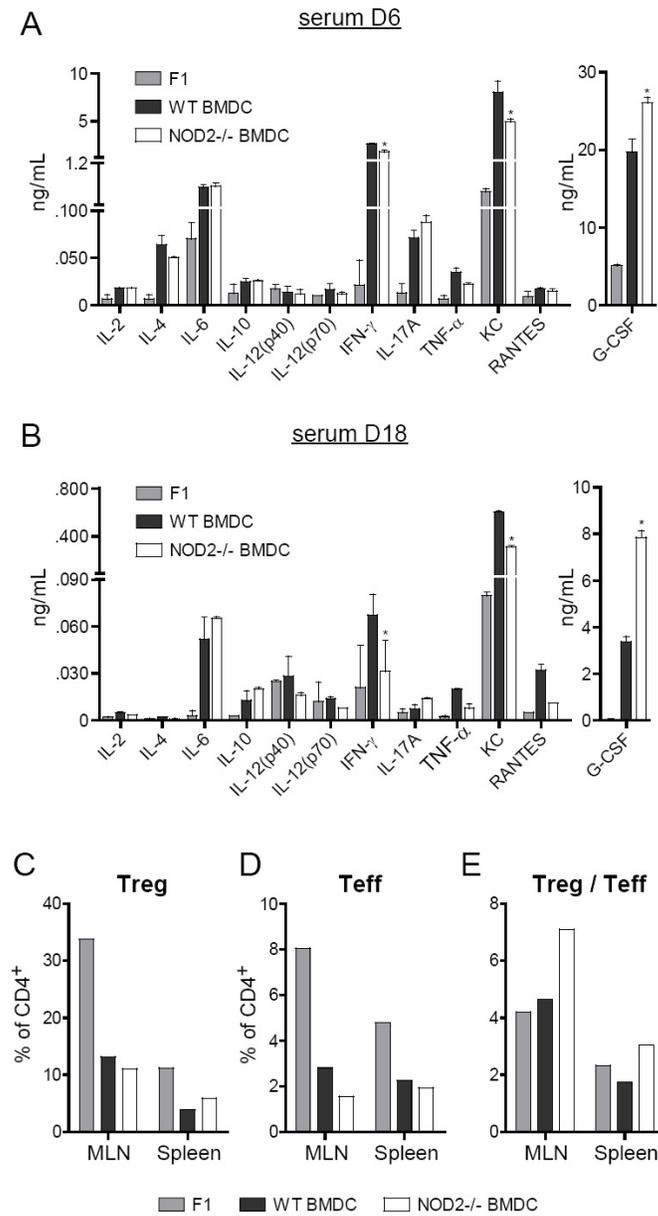


Figure 5. Less IFN- γ with increased G-CSF and Treg:Teff ratio in NOD2^{-/-} BMDC receiving mice. Serum of animals transplanted as described in figure 4 were collected after 6 (A) or 18 (B) days post transplantation. Cytokines were analyzed by multiplex ELISA or by conventional ELISA. Mesenteric lymph nodes and spleen of transplanted F1 animals from the 3 experimental groups were stained for CD4, CD25 and Foxp3 for the evaluation of Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (C) or Teff cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) (D) and the Treg:Teff ratio are showed (E). Data of one experiment representative of 3. * indicate $P < .05$ between WT and Nod2^{-/-} groups.

Figure 6

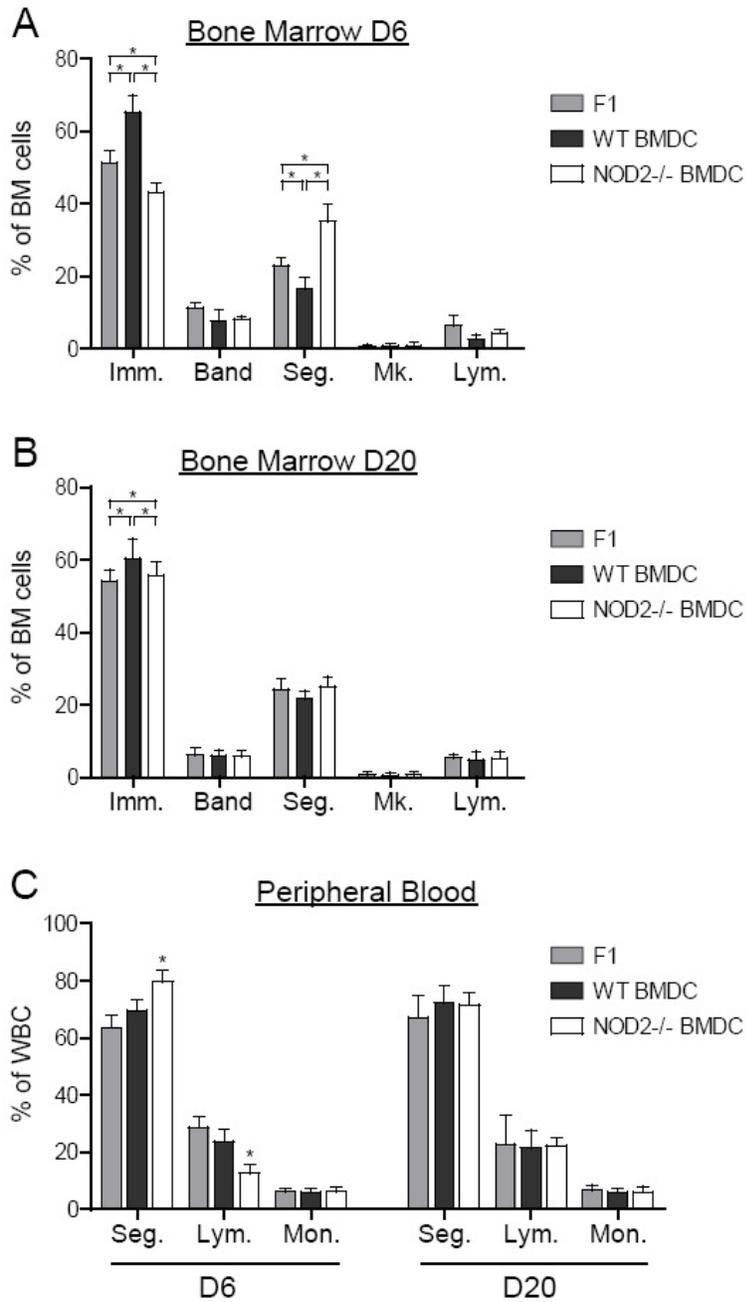


Figure 6. *NOD2*^{-/-} BMDC accelerate engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. Bone marrow from transplanted animals shown in figure 4 were collected and the cytospin performed in day 6 (A) or 20 (B). Differential cell count is shown. (C) Hemogram of the same animals were also performed in days 6 and 20. * indicate $P < .05$. Data representative of 2 experiments.

Nod1 Participates in the Innate Immune Response to *Pseudomonas aeruginosa**

Received for publication, February 11, 2005, and in revised form, August 18, 2005. Published, JBC Papers in Press, September 2, 2005, DOI 10.1074/jbc.M501649200

Leonardo H. Travassos^{†§1,2}, Leticia A. M. Carneiro^{†§2,3}, Stephen E. Girardin^{¶4}, Ivo G. Boneca^{||5}, Ramon Lemos^{†6}, Marcelo T. Bozza[†], Regina C. P. Domingues[†], Anthony J. Coyle^{**}, John Bertin^{**}, Dana J. Philpott^{††7}, and Maria Cristina Plotkowski^{‡7}

From the [†]Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ Cep. 21.941 590, Brazil, [§]Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ Cep. 20551-030, Brazil, [¶]Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, ^{||}Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, and ^{††}Groupe d'Immunité Innée et Signalisation, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France, and ^{**}Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts 02139

The mammalian innate immune system recognizes pathogen-associated molecular patterns through pathogen recognition receptors. Nod1 has been described recently as a cytosolic receptor that detects specifically diaminopimelate-containing muopeptides from Gram-negative bacteria peptidoglycan. In the present study we investigated the potential role of Nod1 in the innate immune response against the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. We demonstrate that Nod1 detects the *P. aeruginosa* peptidoglycan leading to NF- κ B activation and that this activity is diminished in epithelial cells expressing a dominant-negative Nod1 construct or in mouse embryonic fibroblasts from Nod1 knock-out mice infected with *P. aeruginosa*. Finally, we demonstrate that the cytokine secretion kinetics and bacterial killing are altered in Nod1-deficient cells infected with *P. aeruginosa* in the early stages of infection.

Pseudomonas aeruginosa is a typical opportunistic pathogen that can cause a variety of systemic infections, particularly in immunocompromised patients such as those with cancer, AIDS, cystic fibrosis, and burns (1, 2). The virulence of *P. aeruginosa* is multifactorial including several cell-associated and secreted proteins such as elastase A (3), phospholipase C (4), and those translocated through the type III secretion system (5).

The mammalian innate immune system recognizes pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)⁸ through pathogen recognition

receptors (PRRs). PAMPs are conserved structures present in all or large groups of microorganisms but are absent in mammalian cells. PRRs are located either at the cell membrane, where they respond to extracellular PAMPs, or in the cytosol of host cells, where they respond to PAMPs that are present in the cytosol (6). Human Toll-like receptors interact mainly with extracellular PAMPs; for example, TLR5 interacts with bacterial flagellin (7), and TLR4 interacts with bacterial lipopolysaccharide (LPS) (8). Signaling through TLRs leads to the activation of NF- κ B and, subsequently, of NF- κ B target genes.

Recent studies have highlighted the importance of Nod1 and Nod2 in innate immunity. It is thought that they act as cytoplasmic sensors of bacteria and bacterial products (5). Nod1 structurally contains a CARD domain, a centrally located nucleotide-binding oligomerization domain, and multiple C-terminal leucine-rich repeats. Nod1 engages in a homophilic CARD-CARD interaction with Rip2, a CARD-containing protein kinase that in turn interacts with IKK γ and results in NF- κ B activation (9). Nod1 and Nod2 have been recognized to recognize muopeptides from bacterial peptidoglycan (PG), although they require distinct molecular motifs within PG to achieve this sensing (10).

Although traditionally considered as an extracellular pathogen, *P. aeruginosa* has been shown to be internalized by and to survive within different types of mammalian cells, in particular epithelial respiratory cells from nonjunctional epithelia (1). *P. aeruginosa* infections are usually associated with a marked host inflammatory response, and previous studies have shown that bacterial products such as LPS, flagellin, and CpG DNA from *P. aeruginosa* are strong stimuli for TLR4 (11), TLR5 (12), and TLR9 (13), respectively.

In this study we investigated the ability of *P. aeruginosa* to induce NF- κ B activation through Nod1. Our results demonstrate that in addition to data from literature that show the role of TLRs in the detection of products from *P. aeruginosa*, signaling through Nod1 constitutes a potential important back-up system against *P. aeruginosa*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—The human embryonic kidney epithelial cell line HEK293T were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. Cells were maintained in 95% air, 5% CO₂ at 37 °C.

Isolation of Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs)—Wild-type and Nod1 knock-out mice were used to isolate MEFs as follows. The torsos of 13.5-day-old embryos were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. After removal of the heart and liver, the embryos were transferred to a Petri dish containing fresh PBS, cut into small pieces with a sterile blade, and resuspended in trypsin-EDTA in Hanks' balanced salt solution (Invitrogen). The suspensions were incubated twice

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério de Educação (CAPES/MEC), Brazil. To whom correspondence should be addressed: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde (Bloco I), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes Centro de Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ Cep. 21.941 590. Tel.: 55-21-25626748; Fax: 55-21-25608344; E-mail: ltravassos@ufjf.br.

² These authors contributed equally to this work.

³ Supported by a studentship from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq)/Brazil.

⁴ Supported by a grant from Danone Vitapole, Paris, France and by the Institut Pasteur, Paris, France.

⁵ Supported by Fundação para Ciência e Tecnologia, Portugal, and the Institut Pasteur, Paris, France.

⁶ Supported by a studentship from CAPES/MEC, Brazil.

⁷ These authors share senior authorship.

⁸ The abbreviations used are: PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; TLR, Toll-like receptor; PG, peptidoglycan; CARD, caspase activation and recruitment domain; HEK, human embryonic kidney; DAP, diaminopimelate; tri-DAP, DAP tripeptide (L-Ala-D-Glu-meso-DAP); LPS, lipopolysaccharide; MEF, mouse embryonic fibroblast; PBS, phosphate-buffered saline; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; HA, hemagglutinin; DN, dominant negative.

for 20 min at 37 °C under magnetic stirring and then filtered and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The pellet was resuspended in 20 ml of complete medium (DMEM; 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin) and cultured to 90% confluence. Each culture was expanded to five new dishes and frozen in liquid nitrogen. Before use, the cells were thawed in complete medium.

Bacteria and Other Reagents—The following *P. aeruginosa* strains were used in this study. PAO-1, PAK, and a PAK mutant lacking flagellin (PAK Δ fl*c*) (the last two strains were kindly provided by Dr. Steve Lory, Harvard Medical School, Boston, MA). tri-DAP was obtained by treatment of the corresponding MurNac peptide with partially purified *Escherichia coli* N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase according to the method of van Heijenoort *et al.* (14). Muramyl dipeptide (15) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). PG from *P. aeruginosa* PAO-1 was prepared as described previously (16). PG samples were lyophilized in a SpeedVac to estimate the amount of PG and determine the yield per colony-forming unit. Peptidoglycan samples were resuspended in pyrogen-free ultrapure water (Biochrom AG, Berlin, Germany). Amino acid and amino-sugar compositions were determined with a Hitachi L8800 analyzer (ScienceTec, Les Ulis, France) after hydrolysis of samples in 6 M HCl at 95 °C for 16 h. Recombinant TNF- α was from Pharmingen (San Diego, CA).

Infection Protocol—Bacteria were grown in Trypticase soy broth at 37 °C overnight under agitation, harvested by centrifugation, and resuspended in DMEM culture medium to an OD₆₆₀ of 0.1 (~10⁸ colony-forming units/ml). HEK293T cells or MEFs grown to 80% confluence in 24-well plates in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum were infected with bacteria at a multiplicity of infection of 100 or stimulated with flagellin-enriched supernatants from *P. aeruginosa* cultures unless otherwise stated. After incubation for 1 h at 37 °C, extracellular bacteria were removed by washing and by incubation for different periods with DMEM containing 300 μ g/ml gentamicin to kill the remaining extracellular bacteria. Flagellin-enriched supernatants were prepared as follows. Bacterial cells from 96-h-old cultures were harvested by centrifugation, and the supernatants were filter-sterilized with 0.22- μ m membranes and boiled at 100 °C for 30 min to destroy proteins other than flagellin.

Plasmids, Transfection, and Luciferase Assays—Studies on the synergistic activation of NF- κ B by PGs were carried out as described previously (17). Studies on NF- κ B activation following *P. aeruginosa* infection were carried out as described (18). Briefly, cells were transfected with 75 ng of the reporter plasmid Ig κ -luc alone or in combination with 3 ng of Nod1-HA or a dominant-negative form of Nod1 (DN-Nod1-HA/ Δ CARD4-HA). The pcDNA3.1 vector was used to balance the transfected DNA concentration. The PG preparations were used at 1 μ g/ml, and tri-DAP or muramyl dipeptide (MurNac-L-Ala-D-isoGln) (10 pmol) were used as the positive and negative control for Nod1, respectively.

Western Blots—HEK293T cells were transfected as described above. Briefly, cells were harvested from 6-well plates to detect Nod1-HA expression. Cells were lysed and kept on ice until separation in SDS-8% PAGE. After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and probed with an anti-HA (Upstate Biotechnology). After three washes, membranes were incubated with an anti-rabbit IgG conjugated to horseradish-peroxidase. Proteins were visualized by Western Lightening ECL labeling (PerkinElmer Life Sciences). Blots were also probed with a control antibody against human β -actin.

Cytokine Measurements—Murine cytokines (TNF- α , MIP-2, and KC) released into the medium were measured using BD Pharmingen

opt enzyme immunoassay kits or R&D Systems' DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay kits.

Intracellular Bacterial Survival—MEFs obtained from wild-type and Nod1 knock-out mice were infected with *P. aeruginosa* for 1 h, washed, and incubated with gentamicin-containing culture medium. After different periods of incubation, the cells were washed with sterile PBS and lysed with 0.1% Triton X-100 in PBS. Viable counts of cell-associated bacteria were determined by serial plating of cell lysates.

Cell Viability Assays—The cell membrane integrity was analyzed by flow cytometry after propidium iodide labeling as described previously (2). Briefly, control non-infected or infected cells were detached from the microplate wells with a 0.05% trypsin, 0.02% EDTA solution and pooled with spontaneously detached cells present in the cell culture supernatants. After rinsing, cells were resuspended in PBS (pH 7.2, containing 1% bovine serum albumin) and incubated with propidium iodide at 5 μ g/ml for 5 min at room temperature. Samples were kept on ice and analyzed with a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) equipped with a standard argon ion laser.

Statistics—Data were analyzed with the Student's *t* test and Mann-Whitney test, as appropriate. Differences in data values were considered significant at a *p* value of less than 0.05.

RESULTS

***P. aeruginosa* Induces NF- κ B Activation in Epithelial Cells**—We first investigated whether *P. aeruginosa* was able to induce NF- κ B activation in HEK293T cells transiently transfected with a Ig κ -luc reporter plasmid. Cells were exposed to different concentrations of a laboratory strain (PAO-1) for 1 h and treated for an additional 3-h period with gentamicin-containing culture medium to eliminate extracellular bacteria. The increase in luciferase activity of infected cells was shown to be up to 5.2 \pm 0.5-fold higher than the increase in non-infected control HEK293T cells. Additionally, the increase in luciferase activity was shown to be dependent on the number of bacteria added to the cells (Fig. 1A).

Flagella Do Not Account for NF- κ B Activation of *P. aeruginosa*-infected Cells—HEK293T cells, although not expressing TLR2 or TLR4, do express TLR5 (20), which recognize bacterial flagellin. Because in our assay HEK293T cells were exposed to a *P. aeruginosa* flagellated strain for 1 h before the gentamicin treatment, and flagellin monomers may be released from the bacterial cell, we could not exclude the participation of TLR5 in the response to *P. aeruginosa* infection detected in our assays. To determine whether flagella accounted for the NF- κ B activation, we compared the levels of luciferase activity following infection with the parental laboratory strain PAK and the nonflagellated mutant PAK Δ fl*c*. As shown in Fig. 1B there was no significant difference in the luciferase activity of cells infected with PAK or PAK Δ fl*c*. Gentamicin protection assays with PAK and PAK Δ fl*c* showed no difference in the invasive ability between these two strains (data not shown). Interestingly, the flagellin-enriched supernatant from the PAK strain was still capable of inducing high levels of NF- κ B activation, whereas the supernatant of the PAK Δ fl*c* strain had no activity, demonstrating that the flagellin monomers of *P. aeruginosa* are a potent proinflammatory stimulus (Fig. 1B). The results suggest that flagellin monomers are a better stimulus for TLR5 than the assembled molecule, as described previously (21).

Nod1 Participates in the Innate Immune Response to *P. aeruginosa* Infection—The observation that PAK Δ fl*c* strain could still induce NF- κ B activation, apparently in a TLR-independent manner, led us to hypothesize that the recently described cytosolic receptor Nod1 could be involved in the innate immune recognition of *P. aeruginosa*. It has

P. aeruginosa Detection by Nod1

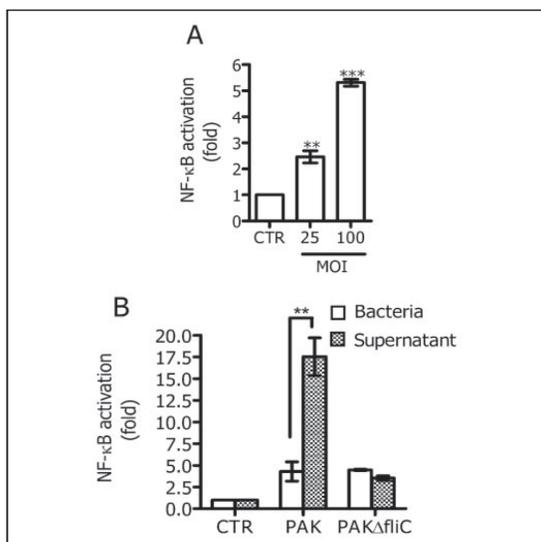


FIGURE 1. A and B, luciferase activity in HEK293T cells transiently transfected with Igκ-luc reporter gene vector and infected with *P. aeruginosa* (PAO-1) at different multiplicities of infection (MOI) (A) and infected with *P. aeruginosa* strains PAK and PAKΔflc at a multiplicity of infection = 100 or exposed to the supernatants of these two strains (B). Data are mean ± S.D. of the results obtained in three assays carried out in duplicate. CTR, control. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

been demonstrated that Nod1 detects DAP-containing muopeptides from the PG of Gram-negative bacteria. To determine whether Nod1 is involved in *P. aeruginosa* detection, we first tested whether the highly purified PG of *P. aeruginosa* is recognized by Nod1. To this end, we co-transfected HEK293T cells with a Nod1 expression vector and the purified PG from *P. aeruginosa*. The PG induced a 7.0-fold increase in the luciferase activity when compared with the nonstimulated control (Fig. 2A). In contrast, the transient transfection of a dominant-negative form of Nod1 (DN-Nod1) expression vector inhibited the activation of the co-transfected Igκ-luc reporter gene in response to *P. aeruginosa* PG by ~3-fold (Fig. 2C). After the observation that *P. aeruginosa* PG was detected by Nod1, we questioned whether Nod1 would participate *in vitro* in the induction of NF-κB during *P. aeruginosa* infection. To this end HEK293T cells transfected with increasing amounts of DN-Nod1 were infected with PAK and PAKΔflc strains. The results showed that luciferase activity was inhibited in response to infection PAK and PAKΔflc strains in a dose-dependent manner (Fig. 3A). Accordingly, MEFs from Nod1-deficient mice infected with PAO-1 strains showed significant lower activation of NF-κB (Fig. 3B).

Nod1 Deficiency Leads to Slower Cytokine Production Kinetics—We next investigated the consequences of Nod1 signaling in the production of proinflammatory cytokines and/or chemokines in response to *P. aeruginosa* infection. To this end MEFs from wild-type and Nod1 knock-out mice were infected with PAO-1 strain for different periods of time, and the supernatants were assayed for the presence of TNF-α, MIP-2, and KC. *P. aeruginosa* infection did not lead to TNF-α or MIP-2 secretion either in the knock-out cells or in the control wild-type cells (data not shown). In contrast, it induced the secretion of high amounts of KC. At 3 h post-infection the wild-type cells secreted significantly more KC than the knock-out cells. However, at the end of 20 h post-infection both wild-type and knock-out cells secreted similar amounts of KC (Fig. 4A).

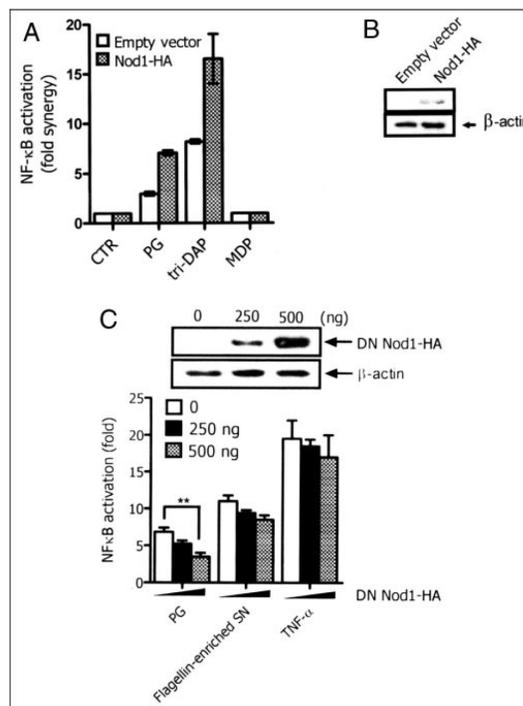


FIGURE 2. A and B, luciferase activity (A) and immunoblot (B) for Nod1-HA expression in HEK293T cells co-transfected with the empty vector or Nod1 expression vector and highly purified PG from *P. aeruginosa*, tri-DAP, or muramyl dipeptide (MDP). C, immunoblot for DN-Nod1-HA and luciferase activity of HEK293T cells co-transfected with the empty vector or with increasing amounts of DN-Nod1 and 1 μg of PAO-1 PG or flagellin-enriched supernatant (SN) from PAO-1. Data are mean ± S.D. of the results obtained in three assays carried out in duplicate. CTR, control. **, $p < 0.01$.

Nod1 Knock-out Cells Show Delayed Bacterial Killing—Data from the literature have suggested that Nod2, expressed in intestinal epithelial cells, may serve as an antibacterial factor. The fact that Nod1 and Nod2 are structurally closely related and that both activate NF-κB through the same adapter protein (22) led us to investigate the survival of internalized *P. aeruginosa* in wild-type and Nod1-deficient cells after different periods of time. As shown in Fig. 4B, it was again in the early periods post-infection (2 h) that we observed a significant difference between wild-type and knock-out cells. The number of intracellular *P. aeruginosa* in Nod1 knock-out cells is significantly higher than in wild-type cells. The difference in bacterial survival decreases with time, and after 10 h both wild-type and knock-out have eliminated intracellular *P. aeruginosa*. Flow cytometry analysis did not show differences in membrane permeability between wild-type and Nod1-deficient cells at 2 h post-infection, indicating that the bacterial killing was not due to the presence of gentamicin in the cells (data not shown).

DISCUSSION

The innate immune system recognizes and responds to an array of bacterial products, such as LPS, lipoproteins, and flagellin, through TLRs (7, 8, 16). These products are highly conserved among both pathogenic and commensal microorganisms. The recognition of PG by PRRs has been shown to be an important feature in the innate immunity of flies and mammals (23). In mammals TLR2 was the first PRR implicated in PG recognition. However, it has been recently demonstrated that TLR2

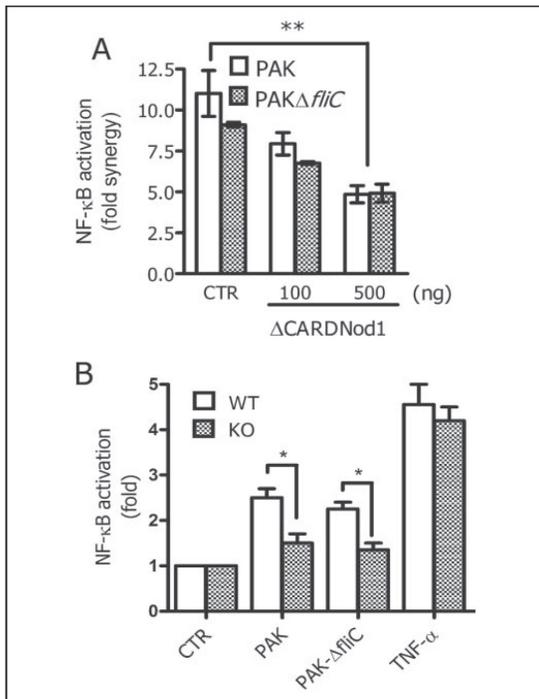


FIGURE 3. A, luciferase activity in HEK293T cells transfected with increasing amounts of Δ CARD Nod1 (DN-Nod1) and infected with *P. aeruginosa* strains PAK and PAK Δ fljC. B, luciferase activity of MEFs from wild-type (WT) and Nod1 knock-out mice (KO) transfected with the reporter gene. Data are mean \pm S.D. of the results obtained in three assays carried out in duplicate. CTR, control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

does not detect PG but likely detects lipoteichoic acid or lipoprotein contaminants in commercial PG preparations, which makes Nod proteins the only known receptors for PG in mammals (8). Nod1 was described as a cytosolic receptor that detects specifically DAP-containing muropeptides from Gram-negative bacterial peptidoglycan. Indeed it has been demonstrated that it plays a major role in the immune response against intracellular bacteria (18). More recently, it has been shown that Nod1 may participate in the detection of *Helicobacter pylori*, an extracellular pathogen that is able to translocate its PG into the host cells (24). In the epithelium, Nod1 plays an important role in the activation of NF- κ B following infection with Gram-negative bacteria that do not activate NF- κ B through TLR signaling pathways (9).

Induction of the host epithelial cell proinflammatory gene program is essential for rapidly activating the host mucosal inflammatory response and is important for bacterial clearance and host survival following infection (25). Several studies indicate that epithelial cells have at least two independent physiologically relevant signaling pathways for activating NF- κ B and epithelial cell proinflammatory genes in response to bacterial infection. One pathway involves TLRs. For example, pathogenic bacteria that have flagella and adhere to or invade epithelial cells can activate NF- κ B and NF- κ B target genes by signaling through the TLR5 receptor (7). Signaling through Nod1 provides epithelial cells with an independent pathway for rapidly activating NF- κ B and the subsequent mucosal inflammatory response, which can favor host survival following infection with bacteria that bypass TLR recognition (26). Importantly, both pathways converge at I κ B kinase, making I κ B kinase

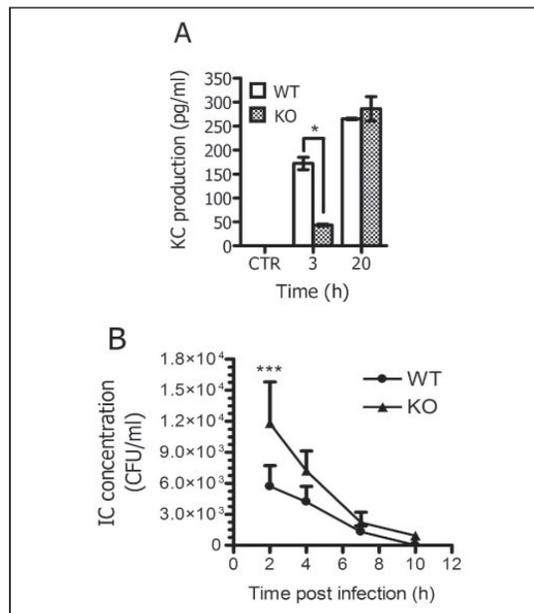


FIGURE 4. A, KC production by mouse embryonic fibroblasts from wild-type (WT) and Nod1 knock-out mice (KO) following infection by *P. aeruginosa* strain PAO-1. B, bacterial viability in mouse embryonic fibroblasts from wild-type and Nod1 knock-out mice after infection with *P. aeruginosa* PAO-1 strain for different periods of time. Data are mean \pm S.D. of the results obtained in two and three independent assays, respectively, carried out in duplicate. CTR, control. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

a key molecular target for manipulating mucosal inflammatory responses that are initiated by host epithelium.

We demonstrated the participation of Nod1, a cytosolic receptor, in the detection of a bacterium that is not considered to be an invasive pathogen. This has been demonstrated using an epithelial cell line that does not express TLRs (except for TLR5) but expresses Nod1 or a dominant-negative form of Nod1. In this case, Nod1 might represent a back-up, in addition to the TLR signaling, in detection of intracellular bacteria or those capable of translocating PG into the cells. In addition, even the strain lacking flagella was able to induce NF- κ B activation via Nod1, once more strengthening the importance of this back-up system against bacteria that may bypass TLR recognition.

P. aeruginosa-induced production of inflammatory mediators is initiated by the interaction between the bacteria and the host cell receptors (27). In the context of an infection, bacteria likely activate the immune response through several PRRs simultaneously. A major effort has been made to identify the molecules responsible for the initiation of *P. aeruginosa*-induced inflammation. Several cell surface molecules have been implicated in the direct interaction with *P. aeruginosa*, including complement receptor 3 (28), ganglioside GM1 (29), and syndecan-1 (30). More recently, independent studies have demonstrated that LPS, flagellin, and CpG DNA from *P. aeruginosa* initiate inflammatory responses through TLR4, TLR5, and TLR9, respectively (12, 13, 31). Thus, even though some PRRs seem to play a more relevant role than others, it is likely that neither of these receptors functions individually as the only component responsible for *P. aeruginosa*-induced immune response *in vivo*. Furthermore, interaction between some of these receptors potentiates their activity. For example, it has been demon-

P. aeruginosa Detection by Nod1

strated recently that Nod1 and TLR4 act synergistically in the induction of proinflammatory cytokines (32, 33).

However, despite all that, we still observed differences in the response to *P. aeruginosa* in MEFs from normal mice and mice deficient in Nod1, all of which express TLRs and other PRRs. This might be because of the elimination of the extracellular bacteria after 1 h of infection in the gentamicin exclusion assays, allowing the observation of a differential response to the intracellular bacteria. Should that be the case it demonstrates again the importance of an intracellular detection system that provides the cells with additional mechanisms to fight the bacteria that manage to reach the cytosol evading extracellular immune responses. Indeed, wild-type MEFs were able to eliminate intracellular bacteria more efficiently than Nod1 knock-out MEFs after 2 h of infection in gentamicin-containing medium. The mechanisms involved in Nod1-dependent intracellular bacterial killing were not investigated in this study. Again, by analogy with TLRs, one can speculate that production of nitric oxide may be involved, but only future investigation will confirm or not such speculations.

Two major features of *P. aeruginosa* infection are the recruitment of neutrophils and the production of various cytokines and chemokines in the local tissue. KC is a CXC chemokine that recruits and activates neutrophils and is up-regulated during infection in epithelial cells. This chemokine is among the earliest new proteins produced at sites of inflammation, consistent with its role in regulating the early infiltration of neutrophils (34). In the present study, Nod-1-deficient cells secreted significantly less KC in the first hours of infection, which might lead to a delay in providing signals that are essential for the onset of inflammatory response by infected epithelial cells. A number of prior studies have observed differential expression of this chemokine, both in terms of cell type and temporal pattern (35, 36). In accordance with our results, in several models of bacterial infection in mice, maximum KC expression occurs in the first hours, whereas MIP-2 (another CXC chemokine that we have tested and that was not detected in periods of infection of up to 24 h) peaks on day 2. Complex temporal patterns of chemokine expression *in vivo* have been reported previously in a number of settings; however, the regulation of such expression has not been explored in detail. In murine models of acute Gram-negative bacterial and fungal pneumonia, these chemokines appear crucial to the innate host defense. Specifically, in a murine model of *Pseudomonas* pneumonia, KC levels are associated with the presence of neutrophils in the lung (19). Furthermore, studies have demonstrated that site-specific transgenic expression of KC resulted in enhanced clearance of bacteria after *Pseudomonas* challenge (36). It will be interesting to look at whether this delayed secretion in Nod1 knock-out mice leads to decreased neutrophil recruitment and exacerbation of disease.

In summary, we conclude that Nod1 expressed by epithelial cells takes part in the activation of NF- κ B and the up-regulated production of an important epithelial cell chemoattractant in response to *P. aeruginosa*. Murine models of infection will help to further elucidate the role of Nod1 in *P. aeruginosa* infection.

REFERENCES

1. Plotkowski, M. C., de Bentzmann, S., Pereira, S. H., Zahm, J. M., Bajolet, L., Roger, P., and Puchelle, E. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 880–890
2. Plotkowski, M. C., Povoja, H. C., Zahm, J. M., Lizard, G., Pereira, G. M., Tournier, J. M.,

- and Puchelle, E. (2002) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 617–626
3. Johnson, D. A., Carter-Hamm, B., and Dralle, W. M. (1982) *Am. Rev. Respir. Dis.* **126**, 1070–1073
4. Wieland, C. W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M. L., Dinarello, C. A., and Fantuzzi, G. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 1352–1358
5. Sato, H., and Frank, D. W. (2004) *Mol. Microbiol.* **53**, 1279–1290
6. Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2004) *Eur. J. Immunol.* **34**, 1777–1782
7. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) *Nature* **410**, 1099–1103
8. Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C., and Boneca, I. G. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 1000–1006
9. Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 14560–14567
10. Girardin, S. E., Travassos, L. H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., Sansonetti, P. J., and Mengin-Lecreux, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41702–41708
11. Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Tsai, J. H., Wilson, C. B., and Miller, S. I. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 354–359
12. Zhang, J., Xu, K., Ambati, B., and Yu, F. S. (2003) *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4247–4254
13. Greene, C. M., Carroll, T. P., Smith, S. G., Taggart, C. C., Devaney, J., Griffin, S., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2005) *J. Immunol.* **174**, 1638–1646
14. Van Heijenoort, J., Parquet, C., Flouret, B., and van Heijenoort, Y. (1975) *Eur. J. Biochem.* **58**, 611–619
15. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 8869–8872
16. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2003) *Science* **300**, 1584–1587
17. Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F. F., Muto, A., and Nunez, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 2551–2554
18. Girardin, S. E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 736–742
19. Kooguchi, K., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kitamura, Y., Kudoh, I., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 3164–3169
20. Smith, M. F., Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A. M., Ryan, K., Crowe, S., and Goldberg, J. B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32552–32560
21. Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003) *Nat. Immunol.* **4**, 1247–1253
22. Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002) *Nature* **416**, 194–199
23. Girardin, S. E., Philpott, D. J., and Lemaître, B. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 932–936
24. Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., and Ferrero, R. L. (2004) *Nat. Immunol.* **5**, 1166–1174
25. Athman, R., and Philpott, D. (2004) *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 25–32
26. Kim, J. G., Lee, S. J., and Kagnoff, M. F. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 1487–1495
27. Cripps, A. W., Dunkley, M. L., Clancy, R. L., and Kyd, J. (1995) *Immunol. Cell Biol.* **73**, 418–424
28. Agramonte-Hevia, J., Gonzalez-Arenas, A., Barrera, D., and Velasco-Velazquez, M. (2002) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**, 255–266
29. de Bentzmann, S., Plotkowski, C., and Puchelle, E. (1996) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, S155–S162
30. Park, P. W., Pier, G. B., Hinkes, M. T., and Bernfield, M. (2001) *Nature* **411**, 98–102
31. Guillot, L., Medjane, S., Le Barille, K., Balloy, V., Danel, C., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2712–2718
32. Fritz, J. H., Girardin, S. E., Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreux, D., Caroff, M., Cavaillon, J. M., Philpott, D. J., and Dib-Conquy, M. (2005) *Eur. J. Immunol.* **35**, 2459–2470
33. van Heel, D. A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K., Foxwell, B. M., Mengin-Lecreux, D., and Playford, R. J. (2005) *Eur. J. Immunol.* **35**, 2471–2476
34. Power, M. R., Peng, Y., Maydanski, E., Marshall, J. S., and Lin, T. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 49315–49322
35. Endlich, B., Armstrong, D., Brodsky, J., Novotny, M., and Hamilton, T. A. (2002) *J. Immunol.* **168**, 3586–3594
36. Tsai, W. C., Strieter, R. M., Mehrad, B., Newstead, M. W., Zeng, X., and Standiford, T. J. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 4289–4296

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](#)