

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

**MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA AO
DESENCADEAMENTO E PROGRESSÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-
HOSPEDEIRO (GVHD) INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

**MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ASSOCIADA AO
DESENCADEAMENTO E PROGRESSÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-
HOSPEDEIRO (GVHD) INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Marina Gomes Miranda e Castor Romero

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de doutor em Fisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadora:

Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Belo Horizonte

2010

Dedico este trabalho a Deus, luz que me dá a vida.

Aos meus pais pelo amor e dedicação e aos meus familiares pelo amparo amigo.

Ao Thiago, luz que Deus colocou em minha vida para fazer-me sorrir.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter abençoado este meu projeto de vida e ter me dado saúde para que eu pudesse cumpri-lo.

À professora Vanessa Pinho por ter me aceitado como aluna, pela sua paciência, sabedoria, carinho e interesse. Por tantas vezes ter assentado comigo na bancada para ensinar-me a melhor forma de se fazer ciência.

Ao Professor Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade da iniciação científica e posteriormente do mestrado e doutorado em seu laboratório, por sua atenção e interesse, pelos seus sábios conselhos e direcionamentos durante todo este período.

Aos professores Massimo Locati e Alberto Mantovani que me deram a oportunidade de fazer parte do grupo Humanitas, onde desenvolvi meu projeto de doutorado com experiência no exterior.

À professora Rosa Maria Esteves Arantes do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela sua atenção e colaboração nas preparações histopatológicas.

À professora Débora Negrão Correa por possibilitar os experimentos com camundongos CCL3^{-/-}, cedendo-os prontamente quando estes foram necessários.

Aos amigos do laboratório de Imunofarmacologia e do laboratório de Biologia do sistema linfóide. Pelo carinho, atenção, pelos vários e bons momentos que passamos juntos e por todas as colaborações. É muito bom dividir a bancada com vocês!

Às queridas Barbarinha, Carolzinha e Pri que me ajudaram incondicionalmente nos sábados, domingos e feriados de experimentos. Este trabalho é nosso!

Ai miei amici della bella Itália, un paese dove sono vissuta e ho imparato tanto. Alla Famiglia Humanitas, per tutto che me hanno insengato, per le feste, la goia, per i giorni di lavoro... ma come me mancano!!!!

Aos técnicos Francisco de Assis (Lab. de Biologia do Sistema Linfóide) e Carlos Henrique (Lab. de Neurobiologia) pela disponibilidade e solicitude com que me atenderam todas as vezes que eu os procurei e por toda a ajuda que me derem quando precisei.

Ao meu companheiro fiel Thiago por ter me ensinado o sentido da palavra amor, por ter me mostrado uma nova perspectiva de vida, por seu entusiasmo e alegria contagiantes que me fazem buscar a essência da vida além dos meus horizontes.

Aos meus amados pais Lincoln e Maria José pelo amor e dedicação. Pela atitude altruísta de abrir mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Por tantas vezes terem me incentivado ao estudo e festejado comigo minhas vitórias.

Às minhas amadas irmãs Andressa, Renata e Camila companheiras para toda a vida. Pela alegria e completude que sinto quando estamos juntas.

Aos meus queridos e novos pais José Roberto e Ivete pelo carinho com que me acolheram, pelo apoio que me dão e pelos momentos agradabilíssimos que passamos juntos.

Aos meus amados avós Osias e Maria Ignês por suas orações para minha saúde e sucesso, pelo exemplo de vida que me deram e pela casa aconchegante que me ofertam nos momentos de lazer e descanso.

Aos meus irmãos de coração: Thaís, Thadeu, Juarez e a todos os meus primos, primas, tios, tias e padrinhos. Pela alegria que me ofertam quando estamos juntos. Deus sabe o quanto eu os amo e rezo por vocês.

Aos meus amigos e anjos de luz Dr. Samuel Abecassis e toda a sua equipe, em especial ao Thibério e Macário pelo apoio, pela luz, pela ajuda incondicional e principalmente por me mostrarem a importância de Deus em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos do ICB pela ótima convivência que tivemos e por tudo que aprendemos juntos.

Aos amigos da secretaria da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia pela solicitude e disponibilidade.

À coordenação e aos professores pela seriedade, competência e zelo com o trabalho que desempenham. Características que fazem a excelência deste programa de pós-graduação em âmbito nacional.

Aos colaboradores do CDTN, sempre dispostos a atender-me com todo carinho e atenção. Vocês foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos agentes financiadores desse projeto: CAPES, CNPq, FAPEMIG, Merck-Serono e Innochem.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	07
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Doença do enxerto versus hospedeiro ou <i>Graft-versus-Host Disease</i> (GVHD).....	12
Mediadores inflamatórios lipídicos: Fator de agregação plaquetária.....	15
Mediadores inflamatórios protéicos.....	16
Vias de sinalização de mediadores inflamatórios: Fosfatidilinositol-3-quinase gamma (PI ₃ K _γ).....	19
Justificativa.....	23
Objetivos.....	24
Material e Métodos.....	26
Resultados.....	39
Participação do PAFR e efeito do tratamento com seu antagonista na GVHD.....	39
Participação da CCL3 e efeito do seu bloqueio na GVHD.....	48
Participação da via de sinalização intracelular através da enzima PI ₃ K _γ na GVHD.....	57
Resposta do enxerto-versus-tumor.....	65
Discussão.....	67
Conclusão.....	78
Referências bibliográficas.....	79
Anexos.....	88

Lista de Abreviaturas

APC – apresentadora de antígeno

AKT-PKB: serina/treonina proteína quinase - proteína quinase B

BSA: albumina do soro bovino

CCR: receptor de quimiocinas da subfamília CC

CD: célula dendrítica

cDNA: ácido desoxirribonucléico codificante

Co⁶⁰ – cobalto⁶⁰

CXCR: receptor de quimiocinas da subfamília CXC

DNA: ácido desoxirribonucléico

E.L.I.S.A.: Enzyme-linked immunosorbent assays (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FACS: Fluorescence-activated cell sorting (separação celular por ativação de fluorescência)

GVHD – Graft-versus-host disease ou doença do enxerto *versus* hospedeiro

GVT- Graft-versus-tumor response ou resposta do enxerto *versus* tumor

Gy – Gray – unidade de medida radioativa correspondente a 100 rads.

H & E – Hematoxilina e Eosina

HLA - Antígenos de Histocompatibilidade Principal

i.v.: intravenosa

IFN- γ : Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

JAK-STAT - Janus Kinase-signal transducer and activator of transcription

kDa: quilo Dalton

LPS – Lipopolissacarídeo

M: molar

MAP - Mitogen-Activated Protein (proteína ativada por mitógeno)

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein (proteína quimioatraente de monócitos)

MHC - Complexo de histocompatibilidade maior

MIP-1 α - Macrophage Inflammatory Protein 1 alfa (proteína inflamatória de macrófagos)

MPO: mieloperoxidase

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

NAG: n-acetilglicosaminidase

NK – Natural Killers

NO – Óxido Nítrico

PBS: tampão fosfato de sódio

PI3K - Phosphatidy Inositol-3-Kinase (fosfatidilinositol 3 quinase)

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride

PAF: fator de ativação plaquetária

PAFR: receptor para o fator de ativação plaquetária

PCA: antagonista específico para o receptor do PAF

RANTES – Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (regulada por meio de ativação, expressa e secretada por células T normais)

RPM: rotações por minuto

RPMI: Meio de cultura - Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

s.c.: subcutânea

TBS: Tris Buffered Saline (solução tampão com tris buffer e salina)

Th: “célula T helper”

TNF- α – Tumor necrosis factor-alpha (fator de necrose tumoral alfa)

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

O transplante de células tronco hematopoiética é única terapia curativa para vários tipos de câncer e doenças auto-imunes. A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) é uma doença secundária ao transplante de células tronco hematopoiética sendo a maior limitação desta terapia. GVHD ocorre quando linfócitos do doador tornam-se ativados contra os antígenos do hospedeiro causando danos a vários órgãos, especialmente ao intestino e fígado, podendo levar a morte do paciente. Entretanto, os linfócitos doados ativados são importantes para a eliminação da doença remanescente, reação denominada resposta do enxerto versus tumor (GVT). Seria então, interessante estudar estratégias que possam diminuir a GVHD sem interferir na GVT. Com esse objetivo este estudo se propôs investigar o envolvimento do mediador lipídico PAF, da quimiocina CCL3 e da enzima PI_3K_γ , na GVHD. Estes mediadores foram escolhidos com o pressuposto de que CCL3 e PAF seriam importantes para a migração de células T e PI_3K_γ seria importante para a sinalização induzida por estas duas moléculas. Para isto, utilizamos um modelo de transplante semi-alogênico, no qual esplenócitos de camundongos C57 foram transferidos para camundongos F1 (C57 x DBA) previamente irradiados. Para verificar o papel de cada molécula na GVHD utilizamos também como doadores camundongos C57 deficientes para o gene do PAFR, da CCL3 ou da enzima PI_3K_γ . Além disso, camundongos receptores de células de C57 selvagens foram tratados com um antagonista específico para o PAFR, PCA4248, ou com uma proteína ligante da quimiocina CCL3, evasina-1, ou com um inibidor específico para a PI_3K_γ , AS605240. Camundongos submetidos à GVHD desenvolveram a doença morrendo em até 45 dias após o transplante. Os órgãos mais acometidos pela GVHD foram o intestino delgado e o fígado, que apresentaram aumento do infiltrado inflamatório associado à destruição do parênquima e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios associados à doença. A ausência nas células doadas ou o bloqueio do PAFR, da CCL3, e da PI_3K_γ protegeram camundongos submetidos à GVHD através da amenização dos sinais clínicos e prevenção da morte. Esta proteção está ligada ao menor recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo e conseqüente diminuição da produção de mediadores inflamatórios importantes para a perpetuação da doença e destruição desses órgãos. Um possível mecanismo que explicaria a menor migração de células inflamatórias para os órgãos alvo seria a interferência do PAFR, da CCL3 e da PI_3K_γ , nas etapas do recrutamento das células inflamatórias. De maneira importante, mostramos também que apesar de diminuir a resposta inflamatória associada à doença, a interferência no PAFR, na CCL3 ou na PI_3K_γ não interferiram na resposta do enxerto-versus-tumor, como verificado pelo uso de células P815 GFP+, o que pode ser considerado para um futuro uso terapêutico dessas moléculas no tratamento da GVHD.

ABSTRACT

Bone marrow transplantation (BMT) is current therapy of choice for several malignancies and severe auto-immune diseases. The induction of GVHD may occur in some patients and is a major limitation of the success of BMT. GVHD occurs when lymphocytes from the donor are activated against antigens of the host. These activated T cells may then inflict damage to several organs, especially the intestine and liver, and may cause death of the recipient. The engraftment process may also cause a graft versus tumor response which is useful for controlling residual malignant diseases. We hypothesized that blockade of certain mediators of inflammation may decrease tissue damage without affecting the ability of the donor cells to engraft and to deal with a tumor. In particular, we have investigated the role of the certain mediators: the lipid mediator PAF, the chemokine CCL3 and signaling molecule PI_3K_γ . The mediators were chosen on the assumption that PAF and CCL3 would be important for trafficking of T cells and that PI_3K_γ is important for the signaling induced by both receptors. We used a model of semi-allogeneic transplant, in which splenocytes from C57 mice are transferred to F1 (C57 vs DBA) mice, which had been previously irradiated. To investigate the role of each molecule donor C57 mice genetically deficient for PAFR, CCL3 or enzyme PI_3K_γ were used. We also used compounds that interfere with the action of these molecules, namely a specific PAFR antagonist, PCA, a CCL3 binding protein, evasin-1 and a specific inhibitor of PI_3K_γ , AS605240. Overall, our experiments show that there is protection, ie. less clinical disease, decreased lethality and decreased liver and intestinal damage, when the gene-deficient mice or drugs were used. This was associated with decreased accumulation of $CD4^+$, $CD8^+$ and macrophages in the target organs. Intravital microscopy showed that absence of PAFR, CCL3 and PI_3K_γ reduce leukocyte interactions with the injured microvasculature. Despite reduced GVHD, graft versus leukemia response was preserved, as assessed by using P815-GFP⁺ cells. Therefore, blockade of PAFR, CCL3 or PI_3K_γ may offer novel therapeutic opportunities for the treatment of GVHD, a tenet that needs to be assessed in clinical trials.

INTRODUÇÃO

Doença do enxerto versus hospedeiro ou *Graft-versus-Host Disease* (GVHD)

O transplante de células tronco hematopoiética é a única terapia curativa para uma série de doenças malignas de origem hematológica tais como: leucemia, linfomas, anemia aplásica, anemia falciforme, anemia de Blackfan-Diamond, talassemias, deficiências imunes e ainda é utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer (Jaksch e Mattsson, 2005; Ferrara e cols., 2009). Entretanto, o sucesso desta terapia muitas vezes não é alcançado devido à ocorrência de uma doença secundária conhecida como doença do enxerto versus hospedeiro ou graft-versus-host disease (GVHD) (Ferrara e cols., 2009). A GVHD é uma doença sistêmica que evolui rapidamente, caracterizada por imunossupressão e lesão tecidual em vários órgãos como intestino, pele, fígado e pulmão (Ferrara e cols., 2005, 2006 e 2009). Esta doença ocorre quando os linfócitos T contidos no transplante reconhecem disparidades antigênicas entre o doador e o receptor (Ball e cols., 2008). Ela pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. Geralmente, a GVHD crônica inicia-se após, aproximadamente, 100 dias do transplante e é semelhante a uma doença auto-imune (Will e Wynn, 2006). Na GVHD aguda, as manifestações da doença ocorrem em um período de duas a seis semanas após o transplante e são decorrentes das lesões dos órgãos alvo envolvendo diarreia, vômitos, erupções cutâneas e disfunção hepática (Will e Wynn, 2006, Ferrara e cols., 2007).

A etiologia da GVHD é complexa. Dos fatores etiológicos relacionados ao doador e ao receptor, o mais importante é a diferença entre os antígenos de Histocompatibilidade principal e menor – HLA e miHag. Quanto maior for o grau de incompatibilidade entre o doador e o receptor, maior é o risco de desenvolver GVHD. A idade dos receptores também

é um fator importante. Aproximadamente 20% dos indivíduos com até 20 anos, que são submetidos a transplante de medula óssea experimentam GVHD aguda e indivíduos com mais de 50 anos de idade têm 80% de chance de desenvolvê-la. Outro importante fator que devemos considerar está relacionado ao sexo do doador em relação ao receptor, devido às diferenças entre o complexo de Histocompatibilidade menor entre mulher e homem (Ferrara e cols., 2005). A fonte das células tronco e o regime de condicionamento também podem favorecer a ocorrência da GVHD. Células tronco do cordão umbilical estão menos associadas à GVHD do que células tronco de outra região. Uma explicação para este fato é que estas células ainda estão imaturas e, portanto, menos funcionais (Ferrara e cols., 2005). Quanto ao regime de condicionamento, vários estudos têm mostrado que a destruição do tecido e a conseqüente secreção de citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da GVHD (Xun e cols. 1994, Gonzales e cols., 2002, Mothy e cols., 2005). O condicionamento leva a uma imunossupressão do receptor, a fim de diminuir a rejeição do enxerto (Mapara e cols., 2006). Este condicionamento é realizado através de irradiação e/ou drogas imunossupressoras (Xun e cols. 1994, Mapara e cols., 2006). Ele pode ser subletal com ablação parcial das células imunes, das hematopoiéticas e das tumorais ou letal com o objetivo de induzir ablação total das células acima citadas (Gonzales e cols., 2002, Mothy e cols., 2005, Mapara e cols., 2006). Todavia, o regime de condicionamento subletal leva a um menor risco de GVHD, uma vez que causa menos destruição dos tecidos do hospedeiro (Gonzales e cols., 2002, Mothy e cols., 2005, Mapara e cols., 2006).

Três fases estão descritas na GVHD aguda (Figura 1). A primeira, conhecida como fase de condicionamento, é conseqüência da quimio ou radioterapia do hospedeiro, que provoca uma predisposição à GVHD. O regime de condicionamento leva a uma super produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e moléculas de adesão (Wysocki e cols., 2005, Jaksch e Mattsson, 2005). Ocorre também, um aumento na expressão de moléculas do

complexo de Histocompatibilidade maior (MHC) e moléculas co-estimulatórias pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Wysocki e cols., 2005, Jaksch e Mattsson, 2005). Após o transplante, período que caracteriza a segunda fase da GVHD, observa-se ativação das células T doadas, pela interação com as células apresentadoras de antígenos (APCs: antigen presentation cells) do hospedeiro, levando à ativação e diferenciação das células T em células T citotóxicas efetoras. Finalmente, a terceira fase conhecida como fase efetora, consiste na destruição dos órgãos alvo pelas células T citotóxicas, que além de liberar substâncias tóxicas para as células, tais como: perforinas, granzimas e espécies reativas de oxigênio, liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, que agem principalmente no recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo, perpetuando a resposta inflamatória e levando à morte (Wysocki e cols., 2005, Jaksch e Mattsson, 2005).

Desde a década de 70, modelos animais vêm sendo utilizados como uma estratégia de estudo da GVHD, visando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória associada à doença (Howard e Woodruff, 1961). A primeira descrição da GVHD aguda foi realizada por cientistas envolvidos em transplantes experimentais de células alogênicas do baço em camundongos previamente irradiados (revisado por Will e Wynn, 2006). A partir destes estudos, novas terapias para a prevenção e controle da doença têm sido sugeridas, mas ainda sem grande sucesso. Um dos modelos animais propostos para o estudo da GVHD consiste no transplante de esplenócitos do camundongo C57BL/6 para o B6D2F1 (que é o cruzamento da linhagem de camundongo C57BL/6 com o DBA/2) (Serody e cols., 1999; Serody e cols., 2000; Tschetter e cols., 2000; EL-Hayek e cols., 2005; Vodanovic-Jankovic e cols., 2006).

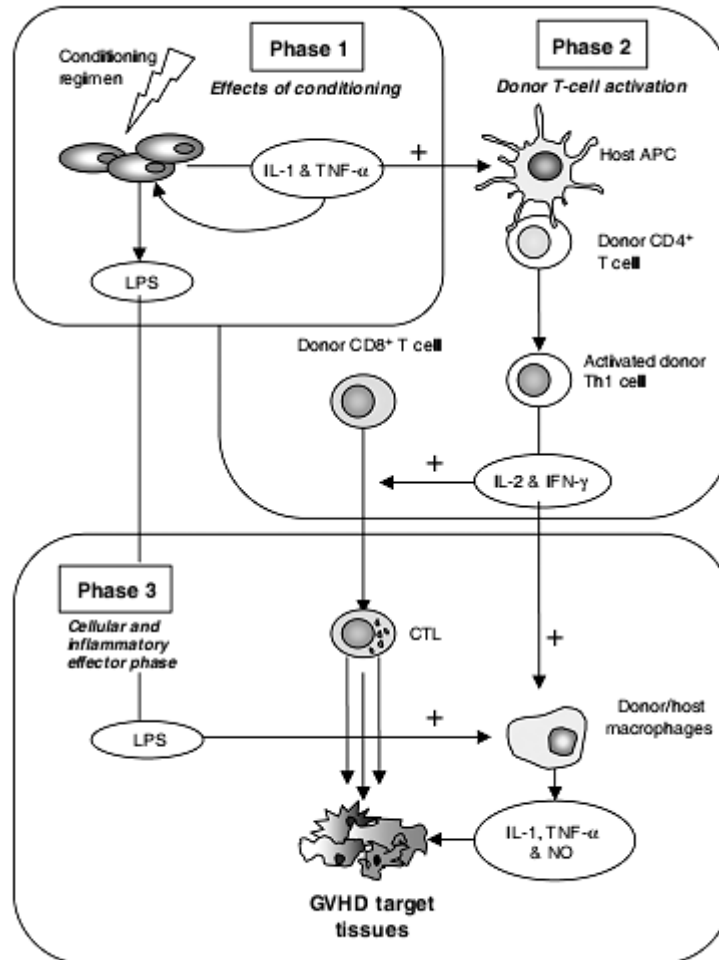


Figura 1 - As três fases do modelo de GVHD agudo. A fase 1 desencadeada pelo regime de condicionamento. A fase 2 onde ocorre a ativação da célula T, a partir da sua interação com a APC e a fase 3 onde a célula T migra para os órgãos alvo e junto aos macrófagos empreendem uma resposta efetora nestes tecido (Jaksch e Mattsson, 2005).

Mediadores Inflamatórios lipídicos: Fator de Agregação plaquetária (PAF)

Os mediadores lipídicos são originados a partir dos fosfolípidios de membrana e estão envolvidos em uma série de funções fisiológicas, além de serem potentes mediadores inflamatórios (Prescott e cols., 2000). Dentre eles, destaca-se o fator de ativação plaquetária – PAF, um mediador fosfolipídico que medeia à ativação e transmigração leucocitária, a produção de superóxido, a ativação de plaquetas e a expressão de fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) (Weijer, e cols., 2003; Ishii & Shimizu, 2000). O PAF

realiza suas funções após ligar-se ao seu receptor que contém sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G heterotrimérica. Após a ligação com o seu receptor o PAF é capaz de ativar várias vias de sinalização intracelular para a execução de suas funções, inclusive a via catalisada pela enzima PI_3K_γ (Honda e cols., 2002). A transmigração de leucócitos é mediada por PAF, através da ativação da célula, modulando a expressão de moléculas de adesão que facilitam a sua passagem através do endotélio e estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (Condliffe, e cols., 1996). A intervenção na via de produção ou na interação do PAF com o seu receptor vem sendo testada em modelos experimentais como uma possível estratégia terapêutica para uma série de doenças inflamatórias (Souza e cols., 2000, Klein e cols., 2002, Souza e cols., 2003, Melnikova e Bar-Eli, 2007, Landgraf e cols., 2007). Outra estratégia para se estudar a modulação da resposta inflamatória mediada pelo PAF é o uso de camundongos deficientes para o gene do seu receptor, já testada em outros estudos, comprovando sua eficiência em diminuir a inflamação em diferentes modelos experimentais (Klein e cols., 2002, Souza e cols., 2003, Ferreira e cols., 2007, Sluijs e cols., 2006).

Mediadores Inflamatórios Protéicos

Dentre os mediadores inflamatórios protéicos, um grupo recebe especial atenção, as citocinas. Estas moléculas são produzidas e liberadas por várias células em resposta a invasão por microorganismos e contato com diferentes antígenos (Hanada e Yoshimura, 2002). Citocinas podem apresentar atividades antiinflamatórias ou pró-inflamatórias, desempenhando funções pleiotrópicas ou totalmente antagônicas uma das outras, onde o determinante dessa variação será o estímulo para a sua secreção e também o órgão alvo da resposta inflamatória (Cavaillon, 2001). No grupo das citocinas merecem especial atenção

as quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas especializadas no recrutamento de leucócitos para sítios inflamados (Charo, 2006).

As quimiocinas formam uma grande família de citocinas quimiotáticas de massa molecular pequena (8-12 KDa) que promovem o recrutamento constitutivo e/ou inflamatório de leucócitos do sangue para os tecidos (Rollins, 1997). Além de apresentarem atividade quimiotática sobre diversos tipos celulares, as quimiocinas estão envolvidas em uma série de outros fenômenos fisiológicos e patológicos, entre eles: diferenciação e ativação celular, organogênese, inflamação, hematopoiese, angiogênese, formação de metástases e, até mesmo, rejeição a tumores (Gerard & Rollins, 2001; Luther & Cyster, 2001; Mackay, 2001). Já foram identificadas cerca de 50 quimiocinas em seres humanos (Charo e cols., 2006). Uma característica desta família é a presença de uma estrutura terciária bastante conservada, composta de três fitas beta-pregueadas seguidas de uma alfa-hélice, estabilizadas por alguns resíduos de cisteína. Dependendo da presença ou ausência de resíduos de aminoácidos intercalados entre as cisteínas amino-terminais, as quimiocinas podem ser segregadas em quatro subfamílias: CC, CXC, C ou CX₃C; determinadas pelo número de aminoácidos que separa os dois resíduos de cisteína na porção amino terminal da cadeia (Charo e cols., 2006). A maior parte das quimiocinas se encontra dentro das subfamílias CC com 28 membros (CCL1 a CCL28) e CXC com 16 membros (CXC1 a CXC16), enquanto a subfamília C é composta por apenas duas quimiocinas (XCL1 e XCL2) e a CX₃C por apenas uma (CX₃CL1) (Murphy e cols., 2000; Murphy e cols., 2002). As quimiocinas se ligam a receptores localizados na superfície celular, contendo sete domínios transmembrânicos, acoplados à proteína G (Charo e cols., 2006). Após essa interação uma série de proteínas e quinases lipídicas são ativadas tais como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI₃K), que leva ao rearranjo do citoesqueleto dos leucócitos e à mudanças na sua afinidade e avidéz às integrinas preparando-o para o recrutamento (Hirsh e cols., 2000, Mellado e

cols., 2001, Fruman e cols., 2002). Como exemplo, podemos citar a quimiocina CCL3 que desempenha um importante papel no recrutamento de leucócitos, sobretudo monócitos, para sítios inflamados (Maurer & Von Stebut, 2004). Concentrações aumentadas de CCL3 têm sido observadas em várias condições inflamatórias graves incluindo artrite reumatóide, fibrose pulmonar idiopática, sarcoidose, asma, dermatite atópica e rejeição a órgãos transplantados (Standiford, 1993; Koch e cols., 1994; Cruikshank e cols., 1995; Hatano e cols., 1999).

Células que estão diretamente envolvidas em promover a resposta imune como monócitos, linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos e células “*Natural Killers*” (NK) podem produzir grandes quantidades de CCL3 (vários nanogramas/10⁶ células). Enquanto plaquetas, osteoblastos, astrócitos e micróglia, células endoteliais, fibroblastos e outras células produzem menor quantidade de quimiocina quando estimuladas. CCL3 produz seus efeitos interagindo com receptores CCR1 e CCR5, que pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e são expressos em vários tipos celulares incluindo monócitos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas (Granelli-Piperno e cols., 1996; Bleul e cols., 1997; Wong & Finn, 1998; Bonecchi e cols., 1999; Elsner e cols., 2000; Maurer & Von Stebut, 2004). CCL3 foi descrita como envolvida na doença do enxerto-versus-hospedeiro (*graft-versus-host disease* ou GVHD) (Serody e cols., 1999 e 2000). Foi descrita também exercendo um papel crucial para o recrutamento de células T da circulação para o tecido inflamado e também um importante papel na migração transendotelial de monócitos, células dendríticas e células NK (Maurer & Von Stebut, 2004).

A explícita participação das quimiocinas no processo fisiopatológico de várias doenças inflamatórias motivou o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que interfiram no sistema de quimiocinas. Neste contexto, o estudo das proteínas ligantes de quimiocinas tem se intensificado nos últimos anos. Sintetizadas a partir da glândula salivar do carrapato

Rhipicephalus sanguineus, as Evasinas, um conjunto de proteínas ligantes de quimiocinas, vêm mostrando-se eficazes na modulação da resposta inflamatória em vários modelos experimentais diferentes. Dentro deste conjunto a evasina-1 se liga com grande afinidade a CCL3 (K_d 0.16nM), e menor afinidade a CCL4 (K_d 0.81nM) e CCL18 (K_d 3,21nM). A evasina-3 se liga a CXCL8 e CXCL11 e a Evasina-4 a CCL5 e CCL11. *In vitro*, evasina-1 liga-se e inativa CCL3 (Frauensschuh e cols., 2007). *In vivo*, tratamento com evasina-1 mostrou-se eficaz em diminuir rolamento, adesão e migração de leucócitos induzidos por CCL3, reduziu a resposta de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, evitando a morte dos animais e reduziu o recrutamento de leucócitos para a pele em modelo experimental de psoríase (Déruaz e cols., 2008). Já Evasina-3 é um potente inibidor de respostas inflamatórias mediadas por neutrófilos, como a artrite induzida por antígenos (Déruaz e cols., 2008). E, estudos relacionados à eficácia da Evasina-4 em modelos experimentais ainda estão sendo realizados (Déruaz e cols., 2008).

Vias de sinalização de mediadores inflamatórios: Fosfatidilinositol-3-quinase gama (PI_3K_γ)

A ligação de mediadores inflamatórios e a ativação de receptores com sete domínios transmembrânicos associados à proteína G podem induzir uma elevação de cálcio intracelular, ativação de diversas proteínas tirosinas-quinases e ativação de uma via que vem ganhando grande importância e que é controlada por uma lipídeo-quinase, a fosfatidilinositol-3-quinase (PI_3K) e seus produtos lipídicos (Hirsh e cols., 2000, Fruman e cols., 2002).

Fosfatidilinositol-3-quinases (PI_3K) são uma família de proteínas que catalisam a fosforilação do grupamento inositol da molécula lipídica fosfatidilinositol levando a produção

de fosfatidilinositol (3)-fosfato, fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato e fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (Curnock e cols., 2002; Cantley, 2002). As PI₃Ks podem ser divididas em três classes principais de acordo com sua especificidade pelo substrato, estrutura e modo de regulação. As PI₃Ks da classe I são heterodímeros constituídos de uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade regulatória e estão presentes no citosol da célula. Essa classe pode ser subdividida em duas subclasses: a classe IA que consiste de PI₃K ativadas por, principalmente, tirosinas-quinases e são constituídas de uma subunidade catalítica (p110 α , β ou γ) e uma subunidade regulatória (p85 α ou β ou p55 γ) e a classe IB (PI₃K γ) que é estimulada pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína G e está associada a uma única subunidade regulatória p101. E, ainda, existem as PI₃K classe II e PI₃K classe III (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999; Kapeller e Cantley, 1994).

Primeiramente, PI₃K foi identificada com atividade associada a várias oncoproteínas e receptores de fatores de crescimento, demonstrando sua participação na proliferação e sobrevivência celular (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999; Fruman e Cantley, 2002). Recentemente, estudos têm demonstrado a importância de PI₃K na migração celular *in vitro* e sua importância na quimiotaxia (Rickert e cols., 2000; Servant e cols., 2000; Hirsch e cols., 2000; Sasaki e cols., 2000; Vicente-Manzanares e cols., 1999). Uma das primeiras evidências da participação da PI₃K na quimiotaxia foi um estudo mostrando que a migração de linfócitos T humanos induzida por RANTES é dependente da PI₃K (Turner e cols., 1995).

Alguns estudos têm demonstrado o papel da PI₃K γ na migração de leucócitos (Sasaki e cols., 2000, Hirsch e cols., 2000, Pinho e cols. 2007). Camundongos faltando a subunidade catalítica p110 da PI₃K γ apresentam um grave defeito na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em um modelo experimental de peritonite induzida por caseína e *Listeria monocytogenes* (Sasaki e cols., 2000). Em outro estudo, macrófagos de

camundongos deficientes em $PI_3K\gamma$ apresentaram migração reduzida frente a uma variedade de estímulos e resposta inflamatória deficiente após indução de peritonite séptica induzida por bactérias gram-positiva e gram-negativa (Hirsch e cols., 2000). Estudos realizados pelo nosso grupo (Pinho e cols., 2007) demonstraram que $PI_3K\gamma$ expressa em eosinófilos é importante para a permanência dessas células na cavidade pleural por 48h. O pré-tratamento de camundongos com inibidores da PI_3K (Wortmannin e LY294002) foi capaz de inibir o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural. Isso era coincidente com uma menor fosforilação de Akt/PKB e produção de IL-5 na pleura, além de uma diminuição na saída de eosinófilos da medula óssea. Interessantemente, a injeção de inibidores da PI_3K , 24h depois do desafio com antígeno, reduziu o número de eosinófilos na cavidade pleural. A redução de eosinófilos estava associada a inibição da fosforilação de Akt/PKB e um aumento no número de apoptose na pleura. Esses dados demonstram um importante papel da ativação da $PI_3K\gamma$ para manutenção de uma inflamação eosinofílica *in vivo* (Pinho e cols., 2007).

A gravidade da doença do enxerto-versus-hospedeiro está relacionada à destruição dos órgãos alvo da doença. Esta destruição é provocada pelas células inflamatórias encontradas nestes órgãos. Estudos acima citados, mostraram a importância dos mediadores inflamatórios, sobretudo do PAF e da CCL3, e da via de sinalização envolvendo a proteína $PI_3K\gamma$, no recrutamento de células inflamatórias para os sítios de inflamação. Sendo assim, acreditamos que a interferência na ação dessas moléculas possa contribuir para a modulação da resposta inflamatória associada à GVHD contribuindo, futuramente, para a terapia da GVHD em humanos.

JUSTIFICATIVA

O recrutamento de leucócitos é induzido pela ação dos mediadores inflamatórios, incluindo o PAF e as quimiocinas, como a CCL3. Estes mediadores agem através de uma via de sinalização envolvendo a enzima PI_3K_γ . As lesões dos órgãos alvo da GVHD estão associadas à migração de células inflamatórias que levam a destruição destes órgãos. Dessa forma, torna-se relevante estudar o papel do PAF, da CCL3, e da PI_3K_γ no desencadeamento e na progressão da GVHD.

OBJETIVOS

Nosso estudo teve como **objetivo geral** avaliar a participação da CCL3, do PAF e da PI_3K_γ na modulação da resposta inflamatória em modelo murino de doença do enxerto-versus-hospedeiro. E como objetivos específicos:

1. Avaliar o papel do receptor de PAF (PAFR), da quimiocina CCL3 e da enzima fosfatidilinositol-3-quinase gama (PI_3K_γ) no desenvolvimento da GVHD em camundongos.

1.1 Avaliar a evolução dos aspectos clínicos e da sobrevida dos camundongos submetidos à GVHD;

1.2 Avaliar o papel do PAFR, da quimiocina CCL3 e da enzima fosfatidilinositol-3-quinase gama PI_3K_γ na resposta inflamatória associada à GVHD, através do uso de camundongos deficientes para as respectivas moléculas e do uso de bloqueadores da ação das mesmas .

- Avaliar a evolução dos aspectos histopatológicos da doença;

- Avaliar a liberação das citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD aguda, através da dosagem das mesmas utilizando-se a técnica de ELISA no intestino dos animais;

- Avaliar o recrutamento de células inflamatórias em camundongos submetidos à GVHD.

1.3 Avaliar se a interferência no PAFR, na quimiocina CCL3 e na enzima fosfatidilinositol-3-quinase gama PI_3K_γ mudariam a resposta do enxerto-versus-tumor.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Animais

Foram utilizados camundongos com oito a doze semanas de vida, isogênicos das linhagens C57BL/6J e (C57BL/6J x DBA/2) F1 abreviado B6D2F1, machos, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Também foram utilizados C57BL/6J-CCL3^{-/-} (CCL3^{-/-}), C57BL/6J-PAFR^{-/-} (PAFR^{-/-}), C57BL/6J-PI3K γ ^{-/-} (PI3K γ ^{-/-}), provenientes do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Imunologia e Bioquímica da UFMG. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e acesso livre à água e comida. É conveniente ressaltar que todos os procedimentos experimentais realizados na execução deste estudo foram previamente aprovados pelo CETEA-UFMG através dos protocolos: 077/08 e 024/09.

2) Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda

Os camundongos receptores, B6D2F1, foram irradiados subletalmente com 4Gy de radiação gama, fonte de CO⁶⁰. Dois dias após a irradiação eles receberam 3 x 10⁷ esplenócitos dos doadores parentais, C57BL/6J-WT, C57BL/6J-CCL3^{-/-}, C57BL/6J-PAFR^{-/-} ou C57BL/6J-PI3K γ ^{-/-} intravenosamente (Figura 2). O grupo controle do transplante foi realizado utilizando-se camundongos B6D2F1 que receberam células de camundongos também B6D2F1, portanto não desenvolveram a GVHD. Para a realização do transplante uma suspensão de células foi preparada a partir de um “pool” de células do baço. O baço dos camundongos doadores foi retirado e, gentilmente, desmanchado em uma placa de Petri com um auxílio de uma peneira de Nillon em 5 mL de meio RPMI incompleto gelado. Depois, as células foram colocadas em um tubo Falcon e decantadas por 3 minutos para

retirada dos grumos. O macerado de células mais RPMI foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Esta contagem foi realizada a fim de analisar a viabilidade e o número de células a ser injetadas no receptor.

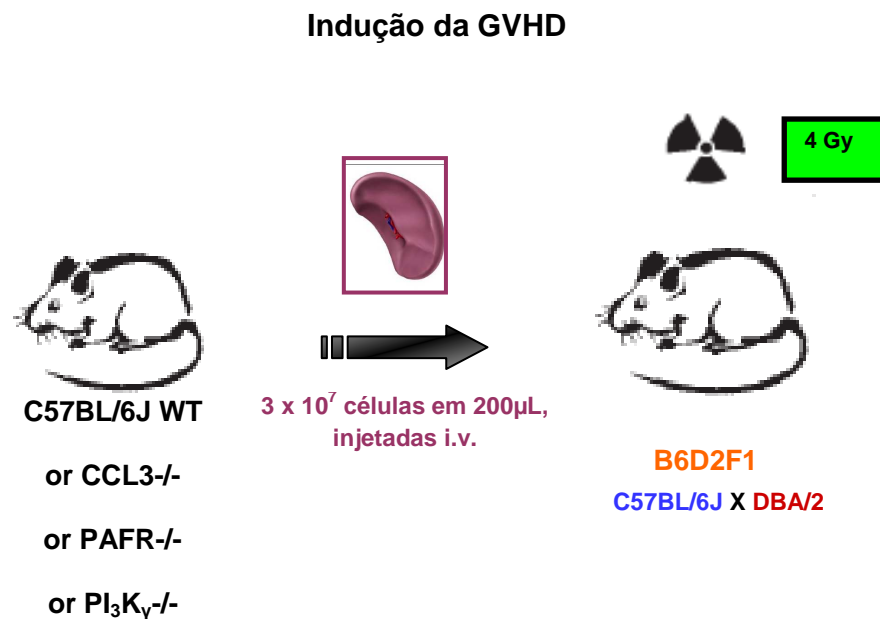


Figura 2 – Indução da GVHD. Dois dias após a irradiação, os camundongos B6D2F1 sofreram transplante de células do baço oriundas dos doadores parentais, C57BL/6JWT, C57BL/6J-CCL3^{-/-}, C57BL/6J-PAFR^{-/-} ou C57BL/6J-PI3K_γ^{-/-}.

3) Tratamentos utilizados

No grupo denominado evasina-1, os animais foram tratados com uma proteína ligante de CCL3, evasina-1 (10µg/animal) diluída em 200 µL de PBS 1x autoclavado. No grupo denominado PCA, os camundongos foram tratados com um antagonista específico do PAFR, denominado PCA (10mg /kg) diluído em PBS a 5% de etanol. No grupo AS605240, os camundongos receberam um inibidor de PI₃K_γ, denominado AS605240 (50mg/kg) dissolvido em 200 µL PBS a 5% de DMSO. E no grupo denominado GVHD, os

camundongos receberam injeção de PBS. Os tratamentos foram realizados por via subcutânea 30 minutos antes do transplante e, após o transplante, a cada 12 horas até o final do experimento (Figura 3).

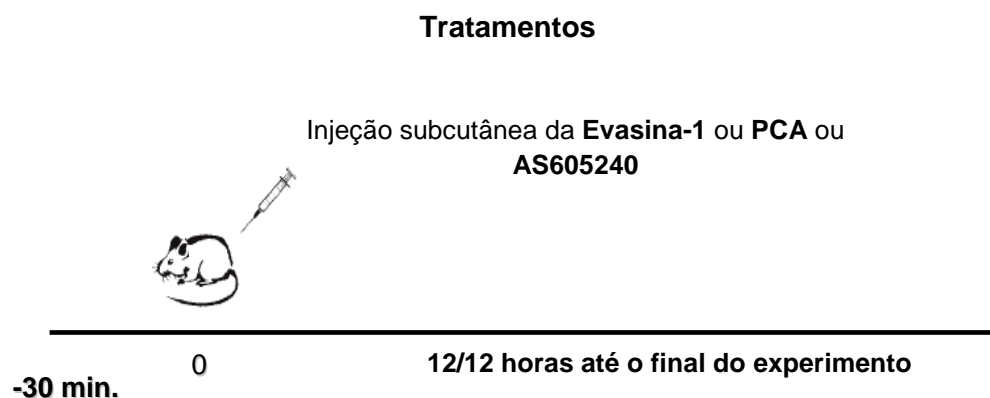


Figura 3 – Tratamentos com evasina-1, PCA ou AS605240. Camundongos do grupo evasina-1, PCA ou AS605240 receberam injeção subcutânea da evasina-1, PCA ou AS605240 30 minutos antes do transplante e de 12 em 12 horas até o final do experimento.

4) Avaliação dos parâmetros clínicos

Após o transplante de esplenócitos, houve acompanhamento dos parâmetros clínicos da GVHD, a cada 2 dias, através de uma escala clínica, com pontuação de 0 a 14 (Figura 4). Esta escala foi criada a partir de uma adaptação de dados obtidos na literatura (Colson e cols., 2004; Cooke, e cols., 1998) e avaliou a variação do peso corporal; o aspecto do pêlo dos camundongos; a descamação da pele, verificada na cauda, na região anal, no pavilhão auricular externo e no focinho; a atividade do camundongo; a postura em flexão do tronco; a ocorrência de diarreia e a presença de sangue oculto nas fezes. O sangue oculto foi verificado através do quito diagnóstico da FECA-CULT™, de acordo com as instruções do fabricante. Estes sete parâmetros foram pontuados de zero a dois,

somando um total de 14 pontos. O aspecto do pêlo, a descamação da pele, a diarreia e o sangue oculto foram pontuados com dois pontos quando presentes ou com zero quando ausentes. A pontuação da variação do peso corporal foi dividida em percentual de peso perdido. Foi pontuado com zero o animal que não teve perda de peso corporal; 0,5 se a perda foi de até 10% do peso corporal inicial; 1,0 se a perda foi entre 10 a 25%; 1,5 se a perda de peso foi entre 25% a 50% em relação ao peso inicial e 2,0 se a perda de peso corporal foi acima de 50%. A postura foi graduada de acordo com o grau de inclinação ou flexão do tronco. O animal ganhou zero quando não tinha nenhuma inclinação aparente; 0,5 para uma leve inclinação; 1,0 para uma inclinação moderada e 2,0 quando a inclinação se agravou, levando o camundongo a assumir uma flexão de tronco próxima do total com aproximação das patas dianteiras às traseiras. A atividade foi pontuada com zero quando não tinha alterações, com 1,0 quando foi observada apatia leve e com 2,0 quando a apatia ficou grave. Os parâmetros clínicos foram analisados de 2 em 2 dias até o grupo GVHD atingir 100% de mortalidade.

Peso	0:sem perda de peso/ 0,5: perda 10% do peso corporal/ 1,0: perda de 10 a 25% / 1,5: perda de 25 a 50%/ 2,0: perda acima de 50%.
Postura	0: sem inclinação aparente/ 0,5: inclinação leve/ 1,0: inclinação moderada/ 2,0: inclinação grave
Atividade	0: sem alteração aparente/ 1,0: apatia leve/ 2,0: letargia grave
Textura do pêlo (pêlo arrepiado)	0: ausência / 2,0: presença
Integridade da pele	0: ausência / 2,0: presença
Sangue oculto nas fezes	0: ausência / 2,0: presença
Diarreia	0: ausência / 2,0: presença
Total	14 pontos

Figura 4 – Escala clínica. Adaptada a partir de dados da literatura para a verificação dos parâmetros clínicos ocasionados pela reação inflamatória gerada pela GVHD.

5) Análise Histopatológica

- Confeção de lâminas histológicas

Porções do intestino delgado (jejuno e íleo) e fígado foram retiradas dos camundongos dos grupos estudados nos períodos 3, 10 e 20 dias após o transplante.

Os intestinos foram retirados inteiros, lavados com PBS1x, estendidos em papel de filtro, e abertos pela borda ante-mesentérica. As porções do jejuno e íleo foram separadas e preparadas em forma de rocamboles (Figura 5), conforme descrito em Arantes & Nogueira (1997). Os rocamboles foram armazenados em formol tamponado (10% em PBS) por 24 horas e, em seguida, em álcool (70%) até o seu processamento. Durante o seu processamento os tecidos sofreram desidratação, realizada através de passagens subseqüentes em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto I, II e II – 30 minutos cada); diafanização com xilol (I e II-20 minutos cada) e embebidos em parafina líquida (Paraplast Sigma) I e II – 30 minutos cada. Os tecidos foram incluídos em formas contendo parafina líquida, onde permaneceram por 24 horas. Os blocos foram levados ao micrótomo e cortes dos tecidos (espessura de 5µm) foram realizados. As lâminas contendo os cortes foram então desparafinizadas (xilol I e II – 20 minutos e álcool absoluto I, II e III, 90%,80%, 70% - 2 minutos em cada) e coradas com hematoxilina de Harris (20 segundos) e eosina (50 segundos), (H&E). Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá sintético. O fígado foi retirado armazenado em formol tamponado (10% em PBS) e foram confeccionadas lâminas histológicas conforme acima descrito.

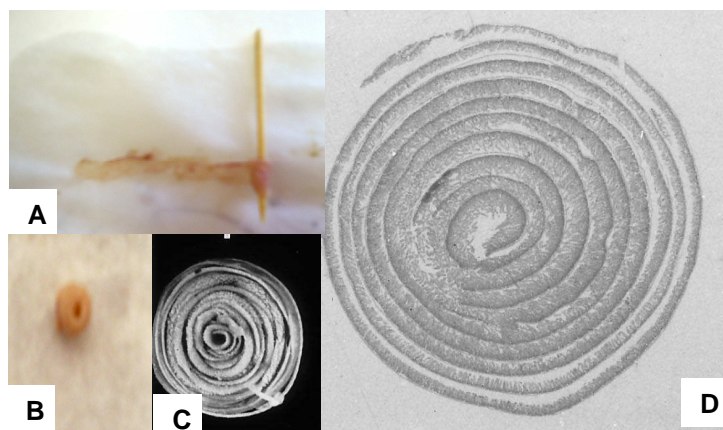


Figura 5 – Preparação dos intestinos para confecção de lâminas histológicas em forma de rocambole. A – os intestinos foram enrolados com a ajuda de um palito de madeira começando o rolo pela sua porção inicial. B – intestino em forma de rolo após imersão em formol. C – Visão superior do intestino em forma de rolo em aumento maior (foto: Arantes & Nogueira, 1997). D – Corte em micrótomo do intestino (foto: Arantes & Nogueira, 1997).

- Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD.

As camadas do epitélio, da lâmina própria, da muscular e da serosa da porção jejuno-íleo dos intestinos e o fígado foram analisados ao microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se objetivas de 10x e 20x. A quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação ocasionada pela GVHD e demais intervenções foi realizada de acordo com uma adaptação de critérios utilizados por vários autores (Colson e cols. 2004; Hill e cols. 1997; Thiele e cols. 1989). Atribuiu-se um valor numérico às alterações observadas nas três camadas dos intestinos de acordo com os critérios abaixo:

Epitélio:

0 = sem alterações;

1 = alterações reacionais discretas;

2 = alterações associadas com erosão ou perda da arquitetura da região das criptas ou da superfície do epitélio;

3 = alterações proliferativas nucleares e hiperplasia do epitélio das criptas ou epitélio de superfície, com ou sem evidências de ulceração e perda das células caliciformes.

Lâmina Própria:

0 = aspecto normal;

1 = discreto aumento de mononucleares na lamina própria;

2 = discreto a moderado aumento de células inflamatórias, edema e congestão;

3 = celularidade aumentada com alargamento das vilosidades, edema e congestão.

Muscular e Serosa:

0 = sem alterações;

1 = discreto infiltrado e edema da serosa;

2 = moderado infiltrado inflamatório da muscular e serosa, em focos;

3 = sinais de necrose isquêmica e intensas alterações inflamatórias da muscular e da serosa.

Utilizando estes critérios somados, a porção do intestino que obteve pontuação de 0 a 3, apresentava-se normal, ou com alterações discretas, 4 a 6 alterações moderadas e 7 a 9 alterações acentuadas. Exemplo: epitélio (3) + lâmina própria (3) + muscular e serosa (3) = pontuação final 9 – alterações acentuadas nas três estruturas (Figura 6). Foram examinados no mínimo três animais por grupo, trabalhando-se com a média obtida por grupo.

No fígado, atribuiu-se um valor numérico às **alterações degenerativas do parênquima** de acordo com os critérios abaixo:

0 = normal;

1 = discreto vacuolização citoplasmática e eosinofilia focal;

2 = difusa vacuolização, alteração da forma do hepatócito, alterações nucleares acentuadas;
3= necrose hepatocitária e vacuolização difusa, alteração da forma do hepatócito e alterações nucleares acentuadas.

E também foi avaliado o **infiltrado inflamatório** com:

0 = nenhum ou raro;

1 = discreto infiltrado na área periportal;

2 = presença de infiltrado discreta ou moderada na área periportal e intralobular;

3 = presença de infiltrado acentuado na área periportal e intralobular;

Cada camundongo recebeu uma graduação gerada pela soma dos 2 critérios acima que poderia chegar a um índice máximo de 6 pontos (Figura 7).

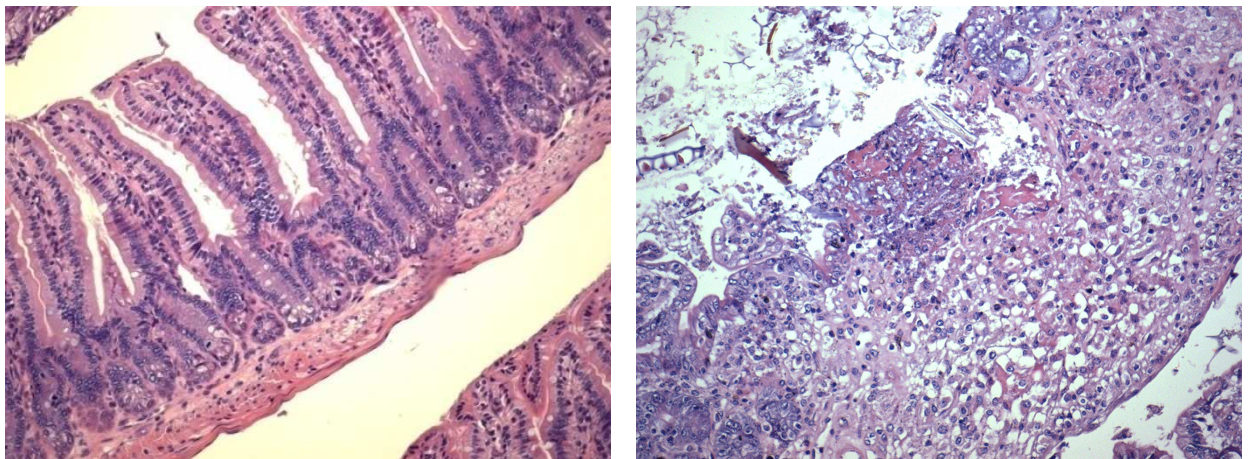


Figura 6 – Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do intestino. À esquerda uma foto de um intestino avaliado com graduação mínima. À direita um intestino avaliado com graduação máxima apresentando hiperplasia do epitélio das criptas com erosões e ulcerações difusas, celularidade aumentada da lâmina própria que se confunde a camada submucosa devido à destruição das vilosidades, edema e congestão. As camadas muscular e serosa apresentam sinais de necrose e intensas alterações inflamatórias.

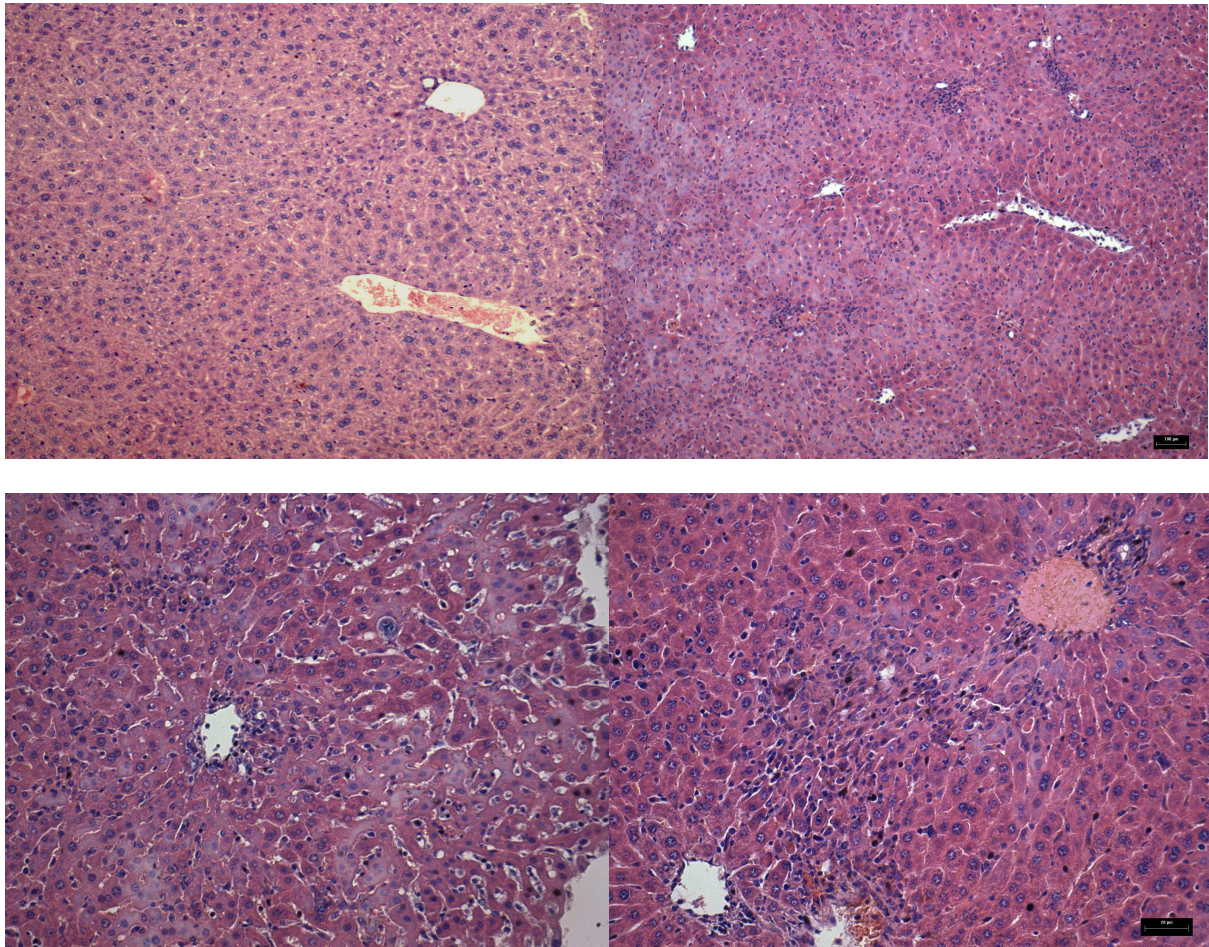


Figura 7 – Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado. À esquerda em cima uma foto de um fígado avaliado com graduação mínima. À direita nas duas presença de congestão vascular com infiltrado acentuado nos vasos da área periportal e veia centro lobular que invade o parênquima hepático. À esquerda em baixo um fígado com sinais necrose hepatocitária alteração da forma do hepatócito e alargamento dos sinusóides.

7) Translocação bacteriana

Para a verificação da translocação bacteriana através da parede intestinal a cavidade abdominal foi lavada com PBS 1x autoclavado e 100µL do líquido recolhido foram espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura. 100µL de sangue e 100mg de fígado do camundongo também foram coletados e espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura. O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 horas de armazenamento da placa em estufa a 37°C.

8) Quantificação de citocinas e quimiocinas

O intestino delgado e o fígado foram retirados 3, 10 e 20 dias após o transplante. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos dos intestinos através de Enzyme-linked immunosorbent assays (E.L.I.S.A.). Cem miligramas da porção jejuno-íleo do intestino delgado (úmido) dos animais dos grupos estudados foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% de Tween20. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 RPM e a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de E.L.I.S.A. com diluição de 1:4. O ensaio E.L.I.S.A. foi realizado mediante instrução do fabricante (R&D System) e lido em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 492nm.

9) Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Uma porção de 100 mg do intestino delgado ou fígado foi ressuspensa em solução salina 0,9% (4° C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida, foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 4° por 10 minutos a 1500 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:10.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24mM. A reação se processou a 37°C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M

(pH 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em leitor de E.L.I.S.A. (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3% (dados não mostrados). Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido úmido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de macrófagos”/100mg de tecido.

10) Imunohistoquímica

No dia 20 após o transplante, o jejuno-íleo e fígado foram removidos intactos, fixados em formol tamponado (10% em PBS), embebidos em parafina, seccionados (3 μ m) e recolhidos em cortes seriados em lâminas de vidro revestidas com 2% 3-aminopropiltriethylsilano (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO). Os cortes foram desparafinizados por imersão em xileno, e este foi seguido por imersão em álcool e depois da incubação com peróxido de hidrogênio 3% diluído em salina tamponada com Tris (TBS) (pH 7,4) por 40 minutos. Os cortes foram então imersos em tampão citrato (pH 6,0, Sigma, P4809) por 20 minutos a 95 ° C para a recuperação antigênica. Logo em seguida, os cortes foram bloqueados por incubação com soro de cabra normal 3% diluído em água destilada, à temperatura ambiente por 20 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários: CD8⁺, CD4⁺, CD11c⁺ anticorpos policlonais, derivados de coelhos, em uma diluição 1:1000, a 4 ° C durante a noite em uma câmara umidificada.

Após a lavagem em TBS, as secções foram tratadas com estreptavidina-biotinilada (LSAB kit, K0492, Dako, Carpinteria, CA). Os cortes foram então incubados em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em uma solução de cromógeno (K3468, Dako) por 2-5 minutos

em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina Mayer. Controles negativos foram obtidos por omissão do anticorpo primário, que foi substituído por 1% PBS-BSA e por *mouse serum* (X501-1, Dako).

11) Análise do recrutamento celular através de Microscopia Intravital

Para a análise através da Microscopia Intravital os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina e cetamina (essa mistura não causa alterações hemodinâmicas que poderiam interferir nos processos de recrutamento de leucócitos). O camundongo anestesiado foi, então, colocado em uma placa contendo sistema de circulação de água a 37°C, importante para manter a temperatura corpórea do animal estável. Uma incisão foi feita na parede abdominal expondo cuidadosamente o mesentério e as alças intestinais. Estes foram abertos sobre uma superfície transparente permitindo a passagem de luz. Um microscópio intravital (Nikon C-SRS H550L; Japan) com uma lente objetiva de 20X foi utilizado para examinar os microvasos intestinal e mesentéricos. Uma câmera digital (Nikon DSQIMC, Japan) acoplada ao microscópio foi usada para projetar imagens a um monitor de computador. Essas imagens foram gravadas para posterior análise usando o programa Imaging software (NIS ELEMENTS-NIKON).

O número de leucócitos rolando e aderentes foi determinado após análise das imagens gravadas. Leucócitos rolando foram definidos como células movendo em uma velocidade menor que aquelas de eritrócitos dentro de um determinado vaso. O número de células rolando foi determinado pela contagem de células passando por um determinado ponto marcado no vaso por minuto. Um leucócito foi considerado aderente quando permanecia parado por pelo menos 30 segundos, e o número de leucócitos

aderentes foi quantificado contando o número de células aderentes dentro de um comprimento de 100µm de vaso.

12) Avaliação da resposta do enxerto contra o tumor (graft versus leukemia)

Uma linhagem celular de mastocitoma murino, P815 (H-2d, American Type Culture Collection, Rockville, MD), transduzida com um vetor (EF1αGFP) foi gentilmente cedida por A. C. Leal e M. Bonamino (Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, Brasil). GVHD foi induzida utilizando o mesmo protocolo descrito no item 2. Após a indução da doença, seis mil células P815 GFP⁺ foram injetadas intravenosamente nos camundongos B6D2F1. Dez dias após a injeção dessas células os camundongos foram sacrificados e seus linfonodos inguinais e mesentéricos foram investigados através da análise por FACS. A concentração de células P815 GFP⁺ nos diferentes grupos estudados nos indicou a potência da resposta do enxerto contra o tumor. Essa resposta é importante quando o transplante de células tronco hematopoiéticas é utilizado como tratamento de tumores, pois as células doadas reagem contra as células tumorais remanescentes melhorando o prognóstico da doença de origem e diminuindo as chances de reincidivas.

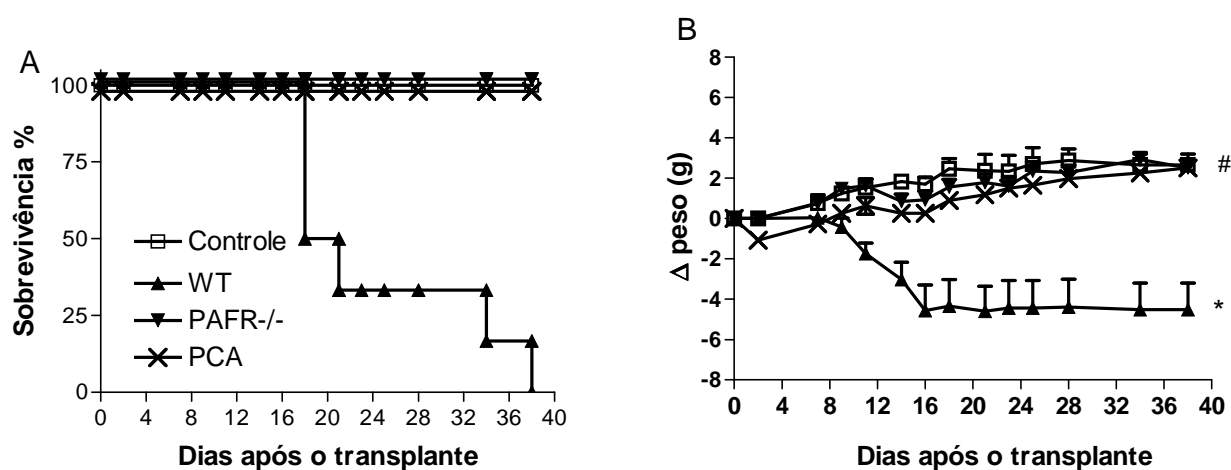
13) Análise estatística

Resultados no texto são mostrados como média e erro padrão da média (\pm SEM). Comparação entre grupos foi realizada através do teste estatístico ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls. O teste estatístico log rank test foi usado para comparar as curvas de sobrevivências. Um $p < .05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Participação do PAFR e efeito do tratamento com seu antagonista na GVHD

Para verificar o papel do PAF no desenvolvimento da GVHD, camundongos F1 receberam esplenócitos deficientes no gene do PAFR ou esplenócitos selvagens mais o tratamento com um antagonista do PAFR, denominado PCA. Após o transplante observamos que a ausência de PAFR na célula doada ou o tratamento com PCA preveniu a morte de camundongos submetidos à GVHD (Figura 8 A). Além disso, a perda de peso e a graduação clínica da doença também foram significativamente diminuídas quando a PAFR foi antagonizado (Figura 8 B-C). Um achado interessante, foi a diminuição do hematócrito observada no vigésimo dia após o transplante, em camundongos que receberam células selvagens. Essa diminuição foi amenizada pelo transplante de esplenócitos deficientes no gene do PAFR (Figura 8D).



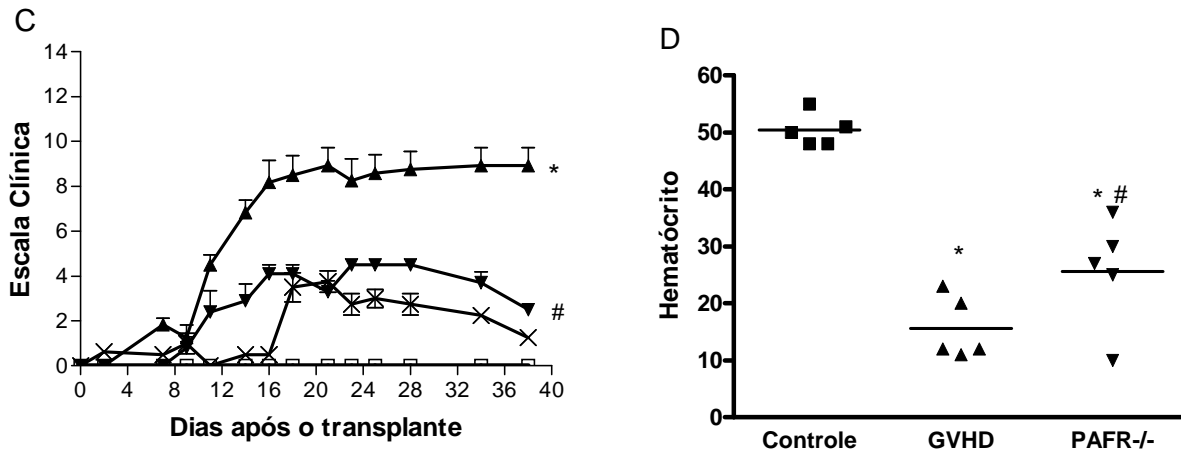


Figura 8 – Ausência de PAFR nas células doadas ou tratamento com PCA preveniu mortalidade e diminuiu a ocorrência dos sinais clínicos da GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PAFR^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Após a indução da doença camundongos foram monitorados a cada 2 dias para o controle da mortalidade (A), do peso corporal (B) da ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (C) e do hematócrito (D). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD, n=8.

A fim de entender os mecanismos envolvidos na proteção da mortalidade e diminuição dos sinais clínicos em camundongos submetidos ao transplante de células deficientes no gene do PAFR, órgãos alvo da doença, intestino e fígado, foram coletados e processados para análise histopatológica nos dias 3, 10 e 20 após o transplante. No dia 3 após o transplante a graduação histopatológica do intestino não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 9A). Entretanto, 10 e 20 dias após o transplante, a graduação histopatológica do grupo que recebeu células deficientes para PAFR foi significativamente menor em relação ao grupo que recebeu células de camundongos selvagens (Figura 9 B-C e 10 A-C). O mesmo foi observado no fígado, no vigésimo dia após o transplante (Figura 9 D e 10 D-F). Vinte dias após o transplante foi observado um menor do número de células CD8⁺ no intestino e no fígado dos camundongos que receberam transplante de células deficientes para o PAFR, corroborando os dados da análise histopatológica (Figura 11 A e B).

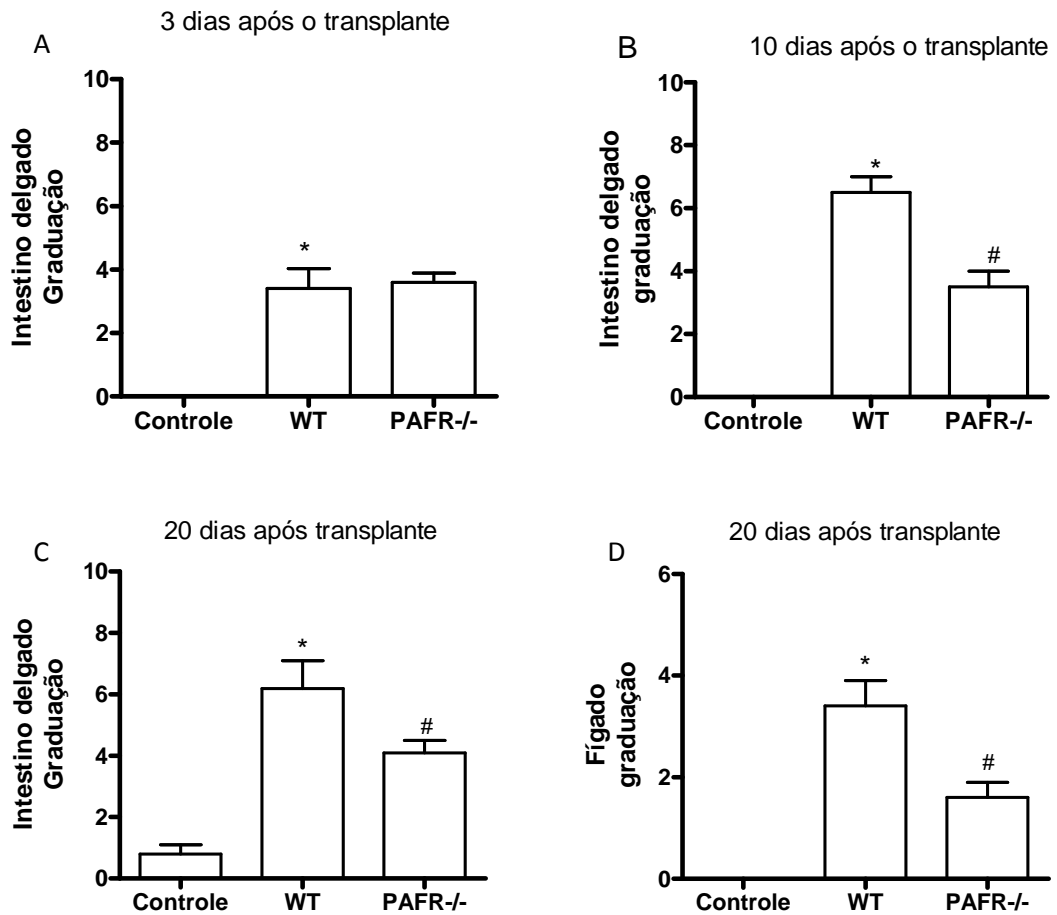


Figura 9 – Ausência do PAFR nas células doadas diminuiu a lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD. Após a indução da doença, os camundongos foram sacrificados e amostras da porção jejuno-íleo do intestino delgado (A-C) e do fígado (D) foram coletadas para análise patológica nos dias 3, 10 e 20 após o transplante. Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD.

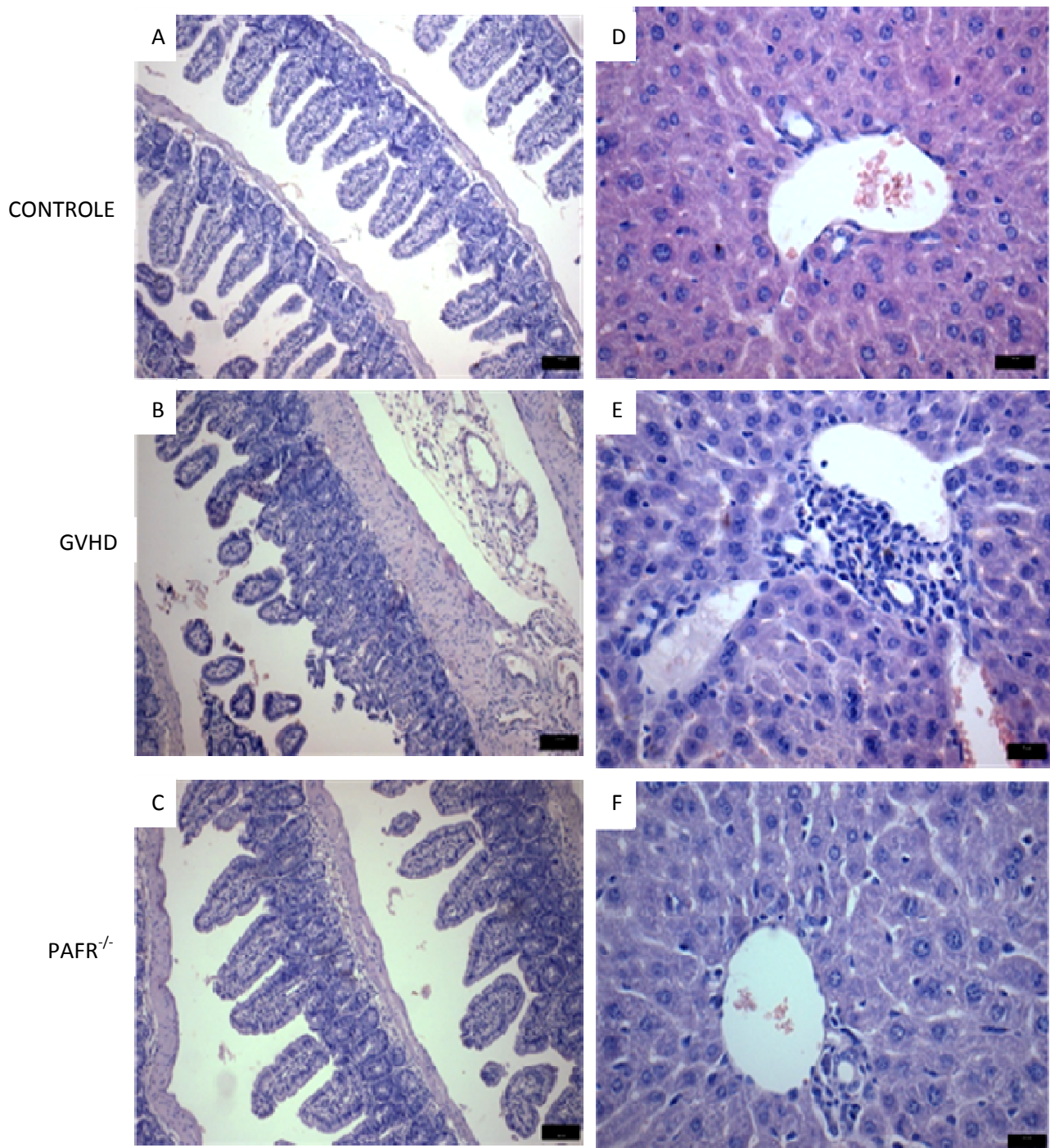


Figura 10 – Representação histológica do intestino e do fígado dos grupos estudados 20 dias após o transplante. Aspecto histológico do intestino delgado de camundongos do grupo controle (A), do grupo que recebeu células selvagens (WT) (B) e do grupo que recebeu células deficientes para o PAFR (C). Escala =100 μ m. Aspecto histológico do fígado de camundongos do grupo controle (A), do grupo que recebeu células selvagens (WT) (B) e do grupo que recebeu células deficientes para o PAFR (C). Escala =20 μ m.

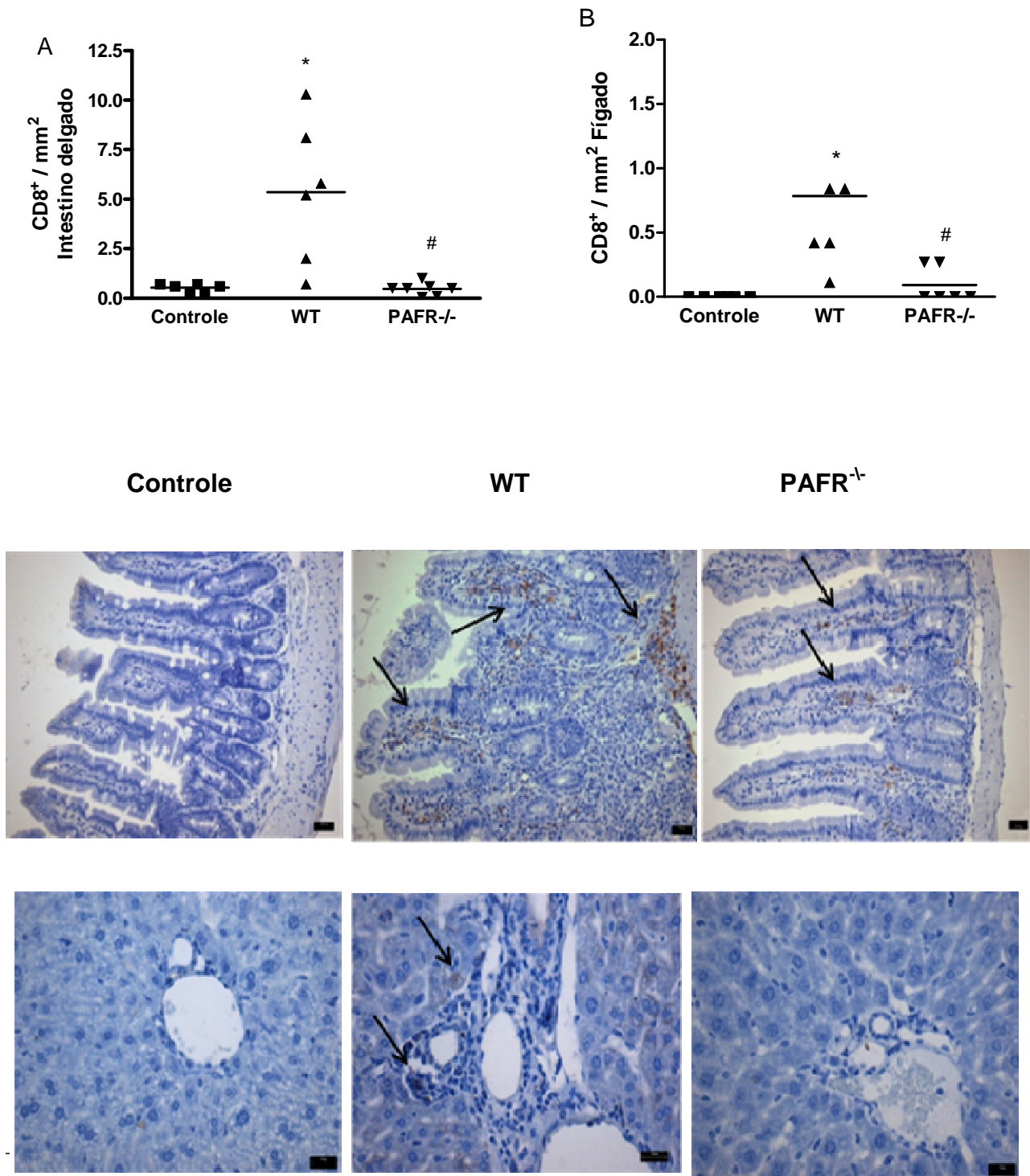


Figura 11 – Ausência do PAFR nas células doadas reduziu o número de células CD8⁺ no intestino delgado e no fígado de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PAFR^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e o número de células CD8⁺ no intestino (A) e no fígado (B) foi quantificado através de imunohistoquímica. Resultados são apresentados como média ± SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD. Escala = 50 µm para o intestino e 20 µm para o fígado.

Coincidentemente à diminuição da lesão dos órgãos alvo mostrada na Figura 9, os níveis das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5, no intestino, nos dias 10 e 20 após o transplante foram significativamente menores nos camundongos que receberam células doadas deficientes para o PAFR em relação aos que receberam células de camundongos selvagens (Figura 12 A-C). Além disso, ainda no intestino, a ausência de PAFR nas células doadas ocasionou uma menor concentração dos níveis de TNF- α e IFN- γ no vigésimo dia após o transplante, em confronto aos elevados níveis destas citocinas encontrados no grupo que recebeu células selvagens, no mesmo período (Figura 12 D e E).

Para verificar o mecanismo pelo qual o receptor do mediador inflamatório lipídico PAF poderia estar atuando na diminuição do infiltrado inflamatório e, consenquentemente, nas lesões dos órgãos alvo, um experimento utilizando microscopia intravital foi realizado com a finalidade de observar se a ausência/bloqueio do PAFR interferiria no rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio de vênulas pós-capilares presentes na parede intestinal. Sendo assim, além do grupo recebendo células deficientes para o PAFR, outro grupo foi feito no qual o antagonista do PAF, PCA, foi administrado subcutaneamente 30 minutos antes da análise para verificar se o bloqueio do PAFR era capaz de interferir com as etapas do processo de recrutamento celular durante a ocorrência da doença. Tanto no grupo submetido ao transplante de células deficientes para o PAFR, quanto no grupo que recebeu o antagonista para o PAFR foi observado um menor número de células rolando e aderidas nas vênulas intestinais, no décimo dia após o transplante (Figura13 A-B).

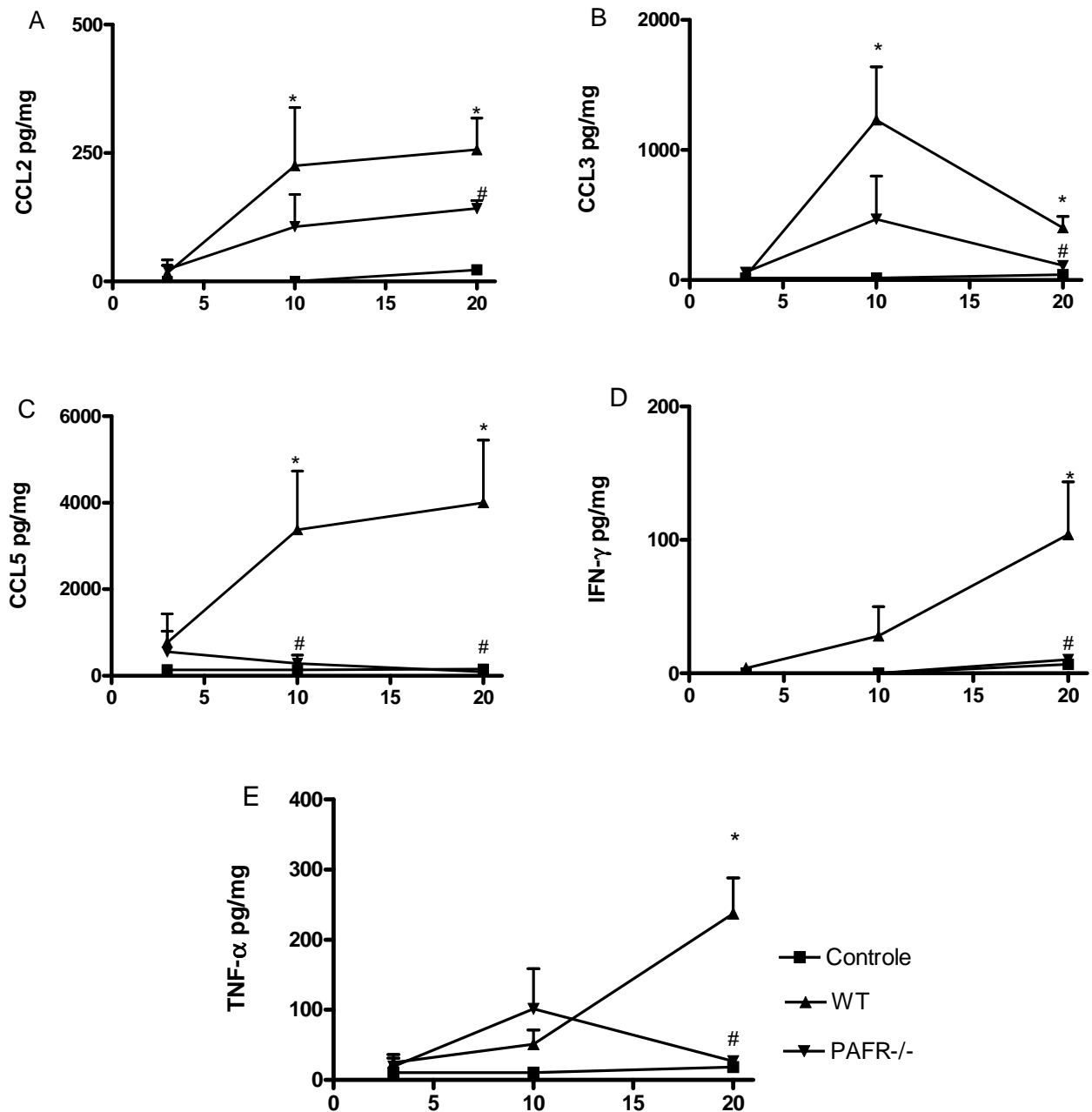


Figure 12 – Ausência do PAFR nas células doadas reduziu a concentração de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6JPAFR^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Nos dias 3, 10 e 20 após a indução da GVHD, camundongos foram sacrificados e a concentração de CCL2 (A), CCL3 (B), CCL5 (C), IFN-γ (D) e TNF-α (E) no intestino foram avaliados por ELISA. Resultados são apresentados como média ± SEM. *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD n=6.

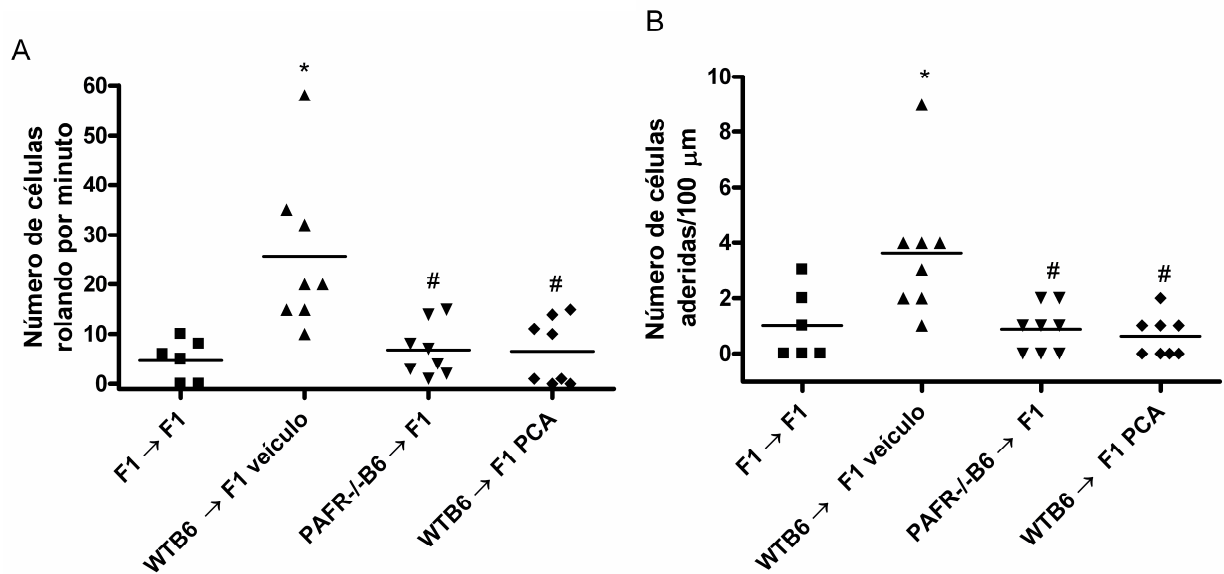


Figura 13 – Importância do receptor do PAF no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas intestinais. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6JPAFR^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Um grupo recebeu uma única dose de PCA apenas 30 minutos antes da análise. E um grupo recebeu apenas PBS 1x a 5% de etanol (veículo) em única dose 30 minutos antes da análise. No dia 10 após o transplante os camundongos foram anestesiados e vênulas intestinais foram selecionadas (20 a 40 μm) para a análise do rolamento e a adesão dos leucócitos. Resultados são apresentados como média ± SEM *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD (grupo controle n=6 e os outros grupos n=8).

Adicionalmente, camundongos que receberam células deficientes para o receptor do PAF tiveram uma menor concentração de bactéria na cavidade abdominal, no sangue e no fígado quando comparados aos camundongos que receberam células selvagens, verificada no vigésimo dia após o transplante (Figura 14). Essa menor translocação bacteriana pode ser devida à menor lesão parede intestinal observada nesses camundongos (Figura 10C).

Participação da CCL3 e efeito do seu bloqueio na GVHD

Uma cinética da produção de CCL3 foi realizada a fim de verificarmos a importância desta quimiocina em nosso modelo. Para isso, esplenócitos de camundongos C57 selvagens ou deficientes para o gene da CCL3 foram transplantados em camundongos B6D2F1. Já no terceiro dia após o transplante observamos elevados níveis da quimiocina no intestino de camundongos que receberam esplenócitos selvagens. Esses níveis se elevaram ainda mais no décimo dia após o transplante e se mantiveram elevados até o vigésimo dia. Entretanto, os camundongos F1 que receberam células de camundongos deficientes para a CCL3, apresentaram níveis da quimiocina significativamente mais baixos nos dias 10 e 20 após o transplante, em comparação aos que receberam células selvagens. Outro aspecto importante, é que os camundongos receptores F1 foram os responsáveis pela produção inicial de CCL3 nos dias 3 e 10 após o transplante, no dia 20 observamos que a produção de CCL3 era dependente das células doadas (Figura 15).

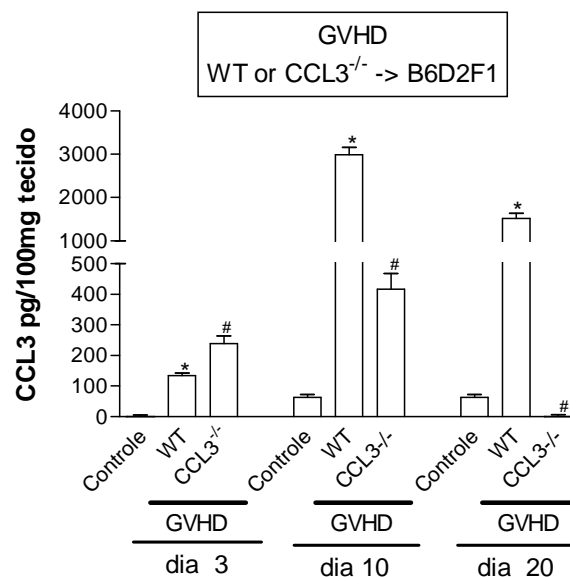


Figura 15 – Cinética da expressão de CCL3 após a indução da GVHD. Amostras do intestino foram coletadas nos dias 3, 10 e 20 após o transplante e CCL3 foi detectada por ELISA em todos os grupos estudados. Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD.

Após a confirmação da participação da CCL3 no desenvolvimento da GVHD em nosso modelo, o foco do nosso estudo foi verificar a ação de uma proteína ligante desta quimiocina, denominada evasina-1, na resposta inflamatória associada à doença. Camundongos que receberam esplenócitos de C57 (grupo GVHD) morreram em até 45 dias após o transplante (Figura 16). Em contraste, o grupo controle não desenvolveu a doença e nenhuma morte foi registrada neste grupo até o final do experimento. Já o transplante de esplenócitos do C57BL/6J-CCL3^{-/-} para B6D2F1 selvagens, resultou em um aumento da sobrevivência (88%) confirmando o papel de CCL3 no desenvolvimento da GVHD (Figura 16 A). A avaliação da variação do peso (Figura 16 B) e da escala clínica (Figura 16 C) para a graduação da doença estão de acordo com o dado da sobrevivência. Posteriormente, tratamos os camundongos receptores com a proteína ligante de CCL3, evasina-1, e obtivemos um resultado similar ao observado no grupo de animais que receberam células CCL3^{-/-}. Dessa forma, os camundongos tratados com evasina-1, 30 minutos antes do transplante e a cada 12 horas até o final do experimento, não morreram e obtiveram uma variação do peso corporal e da escala clínica significativamente mais baixa quando comparados aos camundongos não tratados (Figura 16A-C).

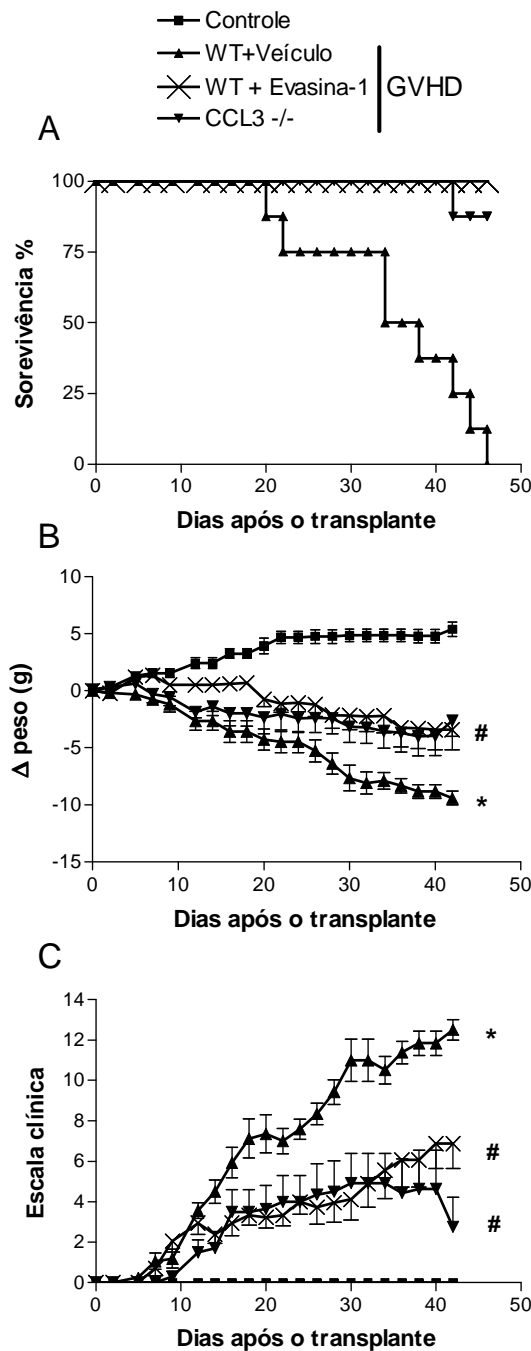


Figura 16 – Ausência da CCL3 na célula doada ou tratamento com evasina-1 diminuiu a mortalidade e a ocorrência dos sinais clínicos da GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-CCL3^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Evasina-1 foi administrada aos camundongos C57 selvagens 30 minutos antes do transplante e a cada 12 h. até o final do experimento. Camundongos foram monitorados a cada 2 dias para o controle da mortalidade (A), do peso corporal (B) e da ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (C). Grupo controle n = 6; grupo que recebeu células selvagens tratado com veículo n = 8; grupo que recebeu células selvagens tratado com evasina-1 n = 9 e grupo que recebeu células CCL3^{-/-} n = 7. *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD.

Com a finalidade de verificar como a evasina-1 poderia interferir na evolução da GVHD induzida em camundongos F1, secções de intestino delgado foram processadas nos dias 3, 10 e 20 após o transplante, para verificação dos parâmetros histopatológicos da doença. No terceiro dia o grupo controle não apresentou alterações significativas no intestino. O grupo GVHD mostrou-se sem alterações muito importantes, exceto por discreto edema e congestão e raras áreas com alterações reacionais do epitélio de revestimento. O grupo tratado com evasina-1 apresentou-se praticamente sem alterações se assemelhando ao grupo controle. O mesmo foi observado no grupo que recebeu células deficientes para a CCL3 (Figura 17 A). No décimo dia o grupo controle manteve-se sem alterações. O grupo GVHD apresentou arquitetura das vilosidades preservada, porém com edema e aumento da celularidade da lamina própria. A infiltração de células inflamatórias atingiu a camada muscular, dissociando as células musculares, que apresentaram sinais degenerativos. O grupo tratado com evasina-1, assim como o grupo que recebeu células deficientes para a CCL3, apresentou discretos edema e aumento da celularidade da lamina própria e a camada muscular estava mais preservada (Figura 17 B). E finalmente, no vigésimo dia, o grupo GVHD apresentou no epitélio alterações proliferativas nucleares e hiperplasia das células das criptas, em áreas próximas a ulcerações. A lâmina própria mostrou aumento da celularidade, edema e congestão. A muscular e serosa apresentaram sinais de necrose e intensas alterações inflamatórias (Figura 17 C e 18B). Neste período, o grupo tratado com evasina-1 (Figura 17 C e 18 C) e o que recebeu células deficientes para a CCL3 (Figura 17 C) apresentaram epitélio com algumas erosões microscópicas superficiais. Na lâmina própria foi possível identificar um discreto aumento da celularidade. Na muscular e serosa não foram encontradas alterações.

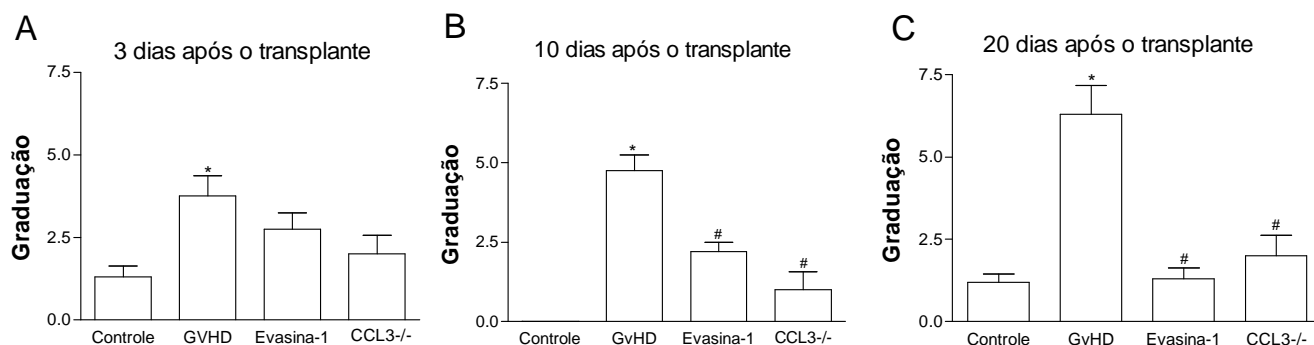


Figura 17 – Tratamento com evasina-1 reduziu a lesão intestinal em camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-CCL3^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Evasina-1 foi administrada aos camundongos C57 selvagens 30 minutos antes do transplante e a cada 12 h. até o final do experimento. Após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e amostras da porção jejuno-íleo do intestino delgado foram coletadas para análise patológica nos dias 3 (A), 10 (B) e 20 (C) após o transplante. Resultados são apresentados como média ± SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD.

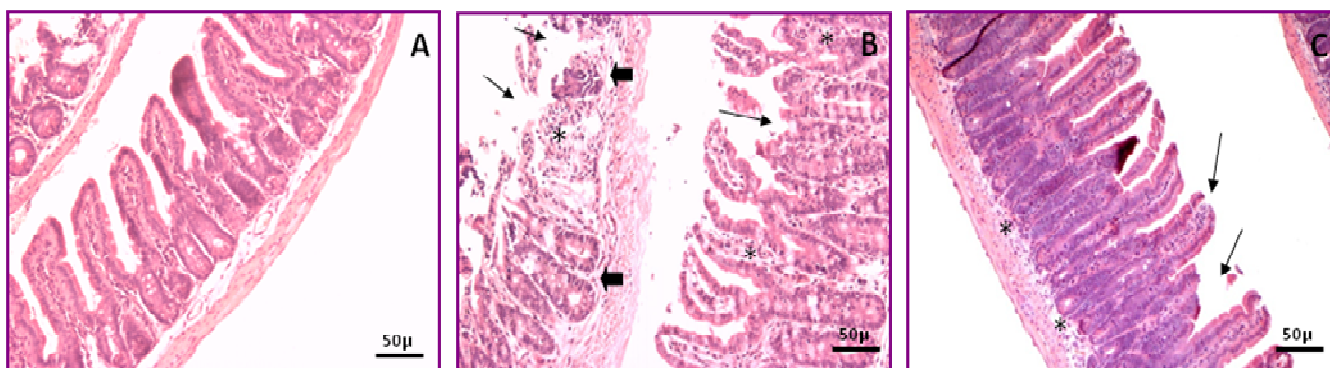


Figura 18: Aspecto histológico de íleos de animais dos grupos controle, GVHD e evasina-1 20 dias após o transplante (H&E, objetiva de 10X). A. Controles apresentam-se sem alterações significativas, exceto por discreto edema e hiperemia da lâmina própria. B. Animais com GVHD apresentam intensas ulcerações da mucosa (setas finas), alterações regenerativas epiteliais que atingem as criptas intestinais (setas largas) e aumento significativo da celularidade e edema da lâmina própria e muscular (*). C. Animais GVHD tratados com evasina-1 apresentam sinais de proteção da mucosa que apresenta raras erosões superficiais (setas finas) e alterações regenerativas restritas à parte mais superficial das vilosidades. Lâmina própria apresenta discreto edema e discreto aumento da celularidade (*). Escala =50 μm para todas as fotos.

Coincidentemente à menor graduação histopatológica encontrada no intestino de camundongos tratados com evasina-1, os níveis de IFN- γ , CCL5 e CCL3 no intestino foram menores em camundongos submetidos ao tratamento em comparação aos camundongos não tratados no vigésimo dia após o transplante (Figura 19). No mesmo período, o número de células inflamatórias importantes para o desenvolvimento da GVHD, tais como, CD4⁺ e CD8⁺ estava diminuído nos camundongos submetidos ao tratamento com evasina-1, comparado aos camundongos não tratados (Figura 20). Também o número relativo de macrófagos foi diminuído no intestino de camundongos tratados com evasina-1 em relação ao grupo GVHD (número relativo de macrófagos/mg de tecido: grupo controle: 5.6×10^7 (± 0.2); grupo GVHD tratado com veículo 8.4×10^7 (± 0.2); grupo tratado com evasina-1: 6.0×10^7 (± 0.1); n=6 e P < 0.05), no vigésimo dia após o transplante.

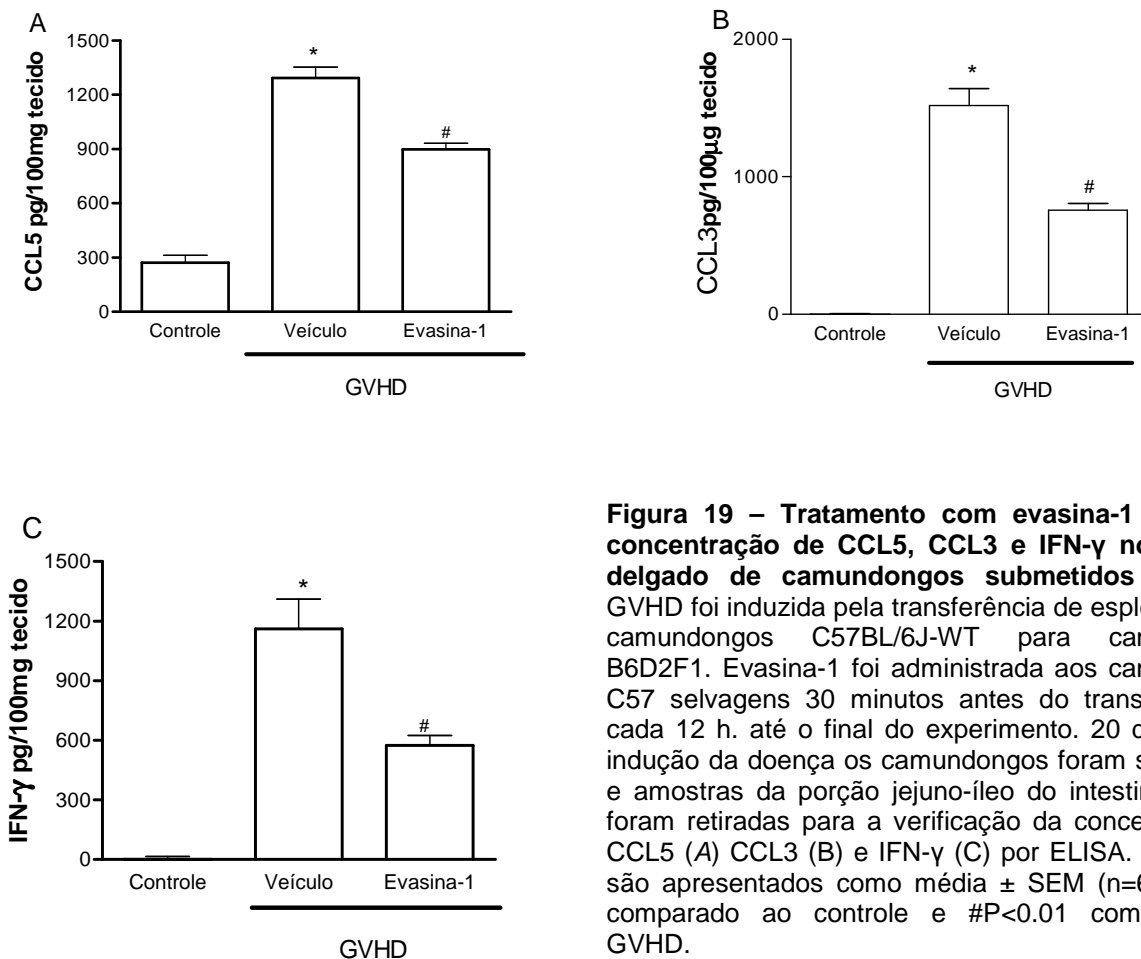


Figura 19 – Tratamento com evasina-1 reduziu a concentração de CCL5, CCL3 e IFN- γ no intestino delgado de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Evasina-1 foi administrada aos camundongos C57 selvagens 30 minutos antes do transplante e a cada 12 h. até o final do experimento. 20 dias após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e amostras da porção jejuno-íleo do intestino delgado foram retiradas para a verificação da concentração de CCL5 (A) CCL3 (B) e IFN- γ (C) por ELISA. Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD.

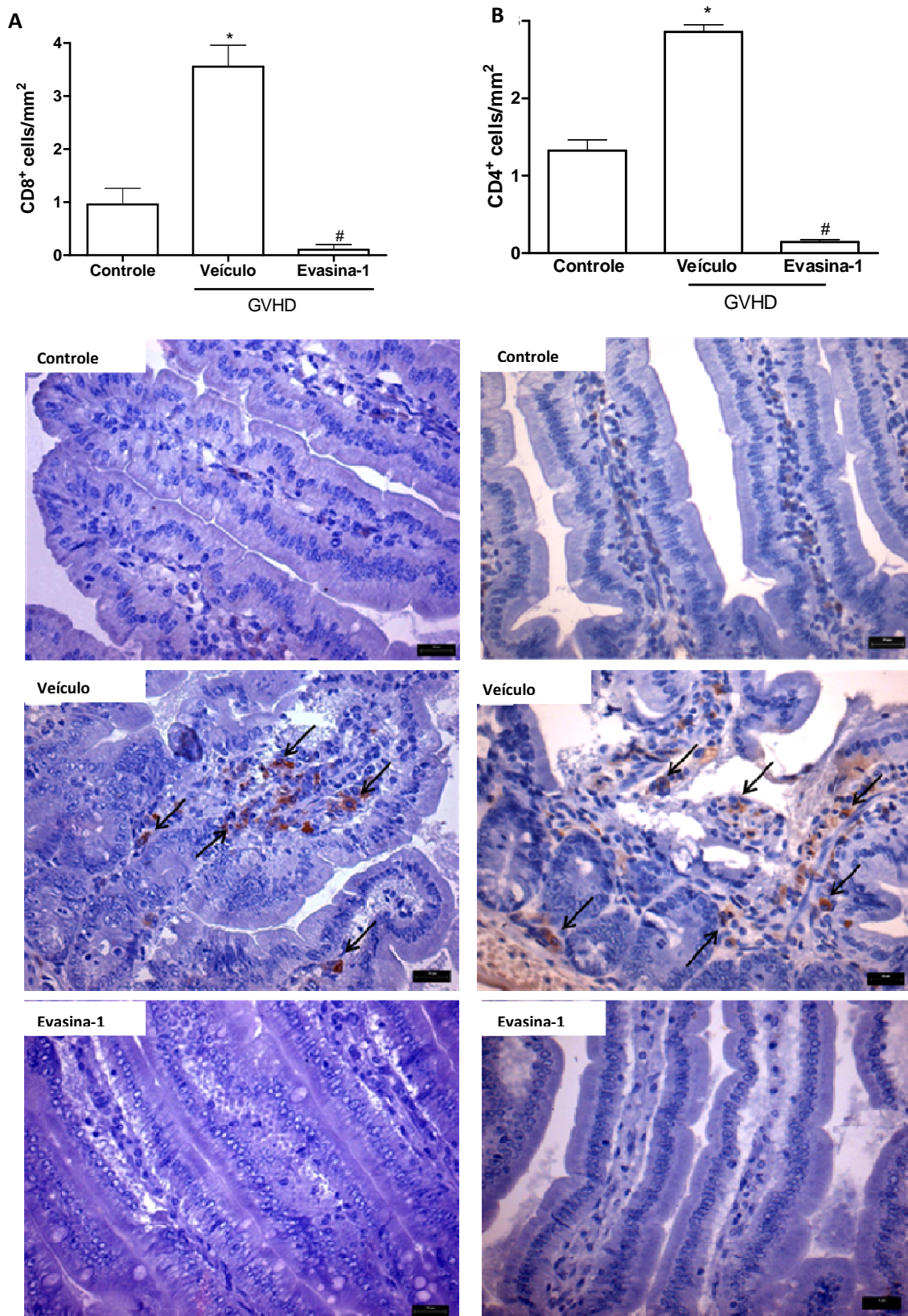


Figura 20 – Tratamento com evasina-1 reduziu a o número de células CD8⁺ e CD4⁺ no intestino delgado de camundongos submetidos à GVHD. 20 dias após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e o número de células CD8⁺ (A) e CD4⁺ (B) foi quantificado através de imunohistoquímica. Resultados são apresentados como média ± SEM (n=4 para o grupo controle e n=5 para os outros grupos). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD. Escala = 20 µm.

Os experimentos acima mostraram um menor número de células inflamatórias no intestino de camundongos submetidos ao tratamento com evasina-1. Como as quimiocinas são importantes para a migração de leucócitos, nos propomos a verificar o efeito do tratamento com evasina-1 na interação do leucócito com o endotélio utilizando microscopia intravital. Para isso, camundongos F1 irradiados receberam esplenócitos de camundongos C57GFP⁺ e foram tratados com evasina-1 durante 20 dias. O grupo controle recebeu apenas o veículo da droga. Como mostrado na Figura 14, os intestinos de camundongos submetidos à GVHD tratados com veículo apresentaram um grande número de células rolando e aderindo na microvasculatura intestinal. O tratamento evasina-1 foi eficaz em diminuir o número de células aderidas ao vaso, no vigésimo dia após o transplante. Além disso, quando a evasina-1 foi administrada apenas 30 minutos antes da realização da microscopia intravital, foi capaz de diminuir a adesão de leucócitos no endotélio intestinal (Figura 21).

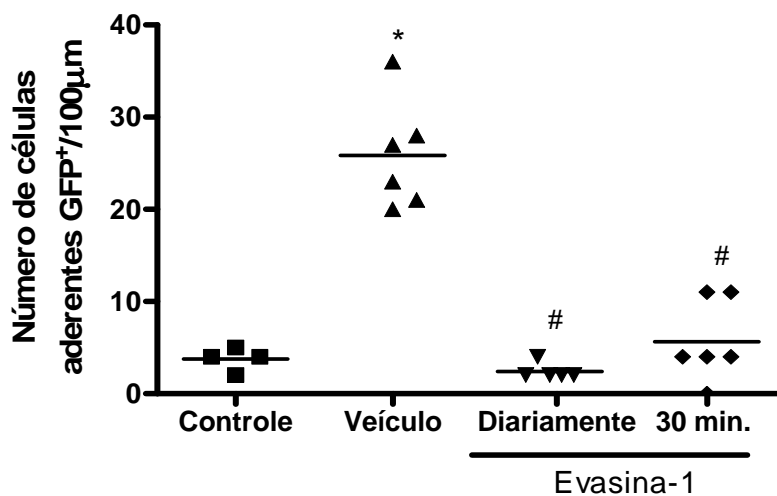


Figura 21 – Efeito do tratamento com evasina-1 sobre o número de células aderentes em vênulas pós-capilares da parede intestinal. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Um grupo recebeu tratamento com evasina-1 30 minutos antes do transplante e a cada 12h até o final do experimento (evasina-1 diariamente). Outro grupo recebeu uma única dose de evasina-1 apenas 30 minutos antes da análise. E um grupo recebeu apenas PBS 1x autoclavado (veículo) em única dose 30 minutos antes da análise. No dia 20 após o transplante os camundongos foram anestesiados e vênulas intestinais foram selecionadas (20 a 40 µm) para a análise da adesão dos leucócitos. Resultados são apresentados como média ± SEM *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD (n=6).

Além da proteção observada no intestino, evasina-1 também foi eficiente em diminuir a resposta inflamatória hepática de camundongos submetidos à GVHD. Em fígado de camundongos tratados com a evasina-1, no vigésimo dia após o transplante, observamos uma menor graduação patológica da doença, um menor infiltrado inflamatório, um número relativo de macrófago reduzido e uma diminuição dos níveis de IFN- γ (Figura 22A-F).

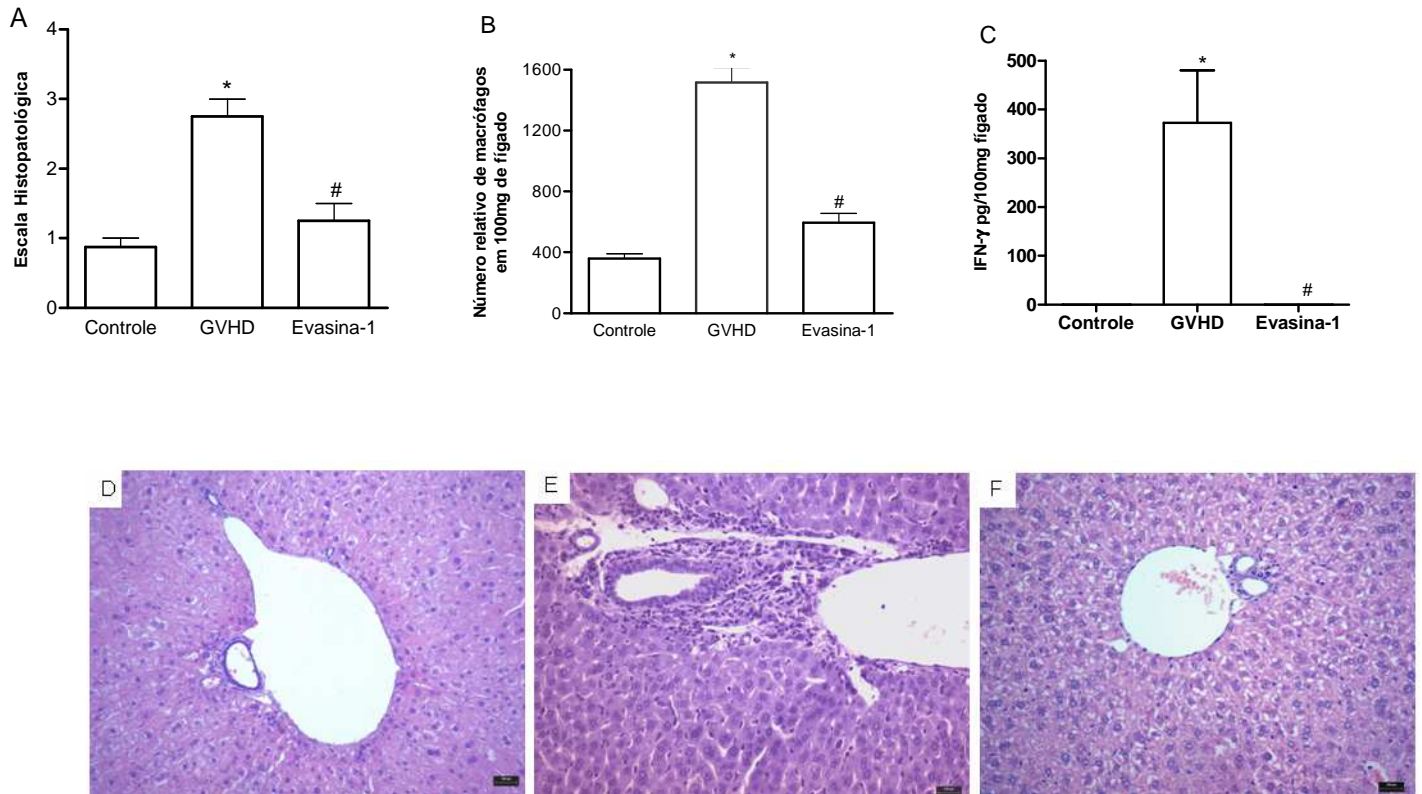
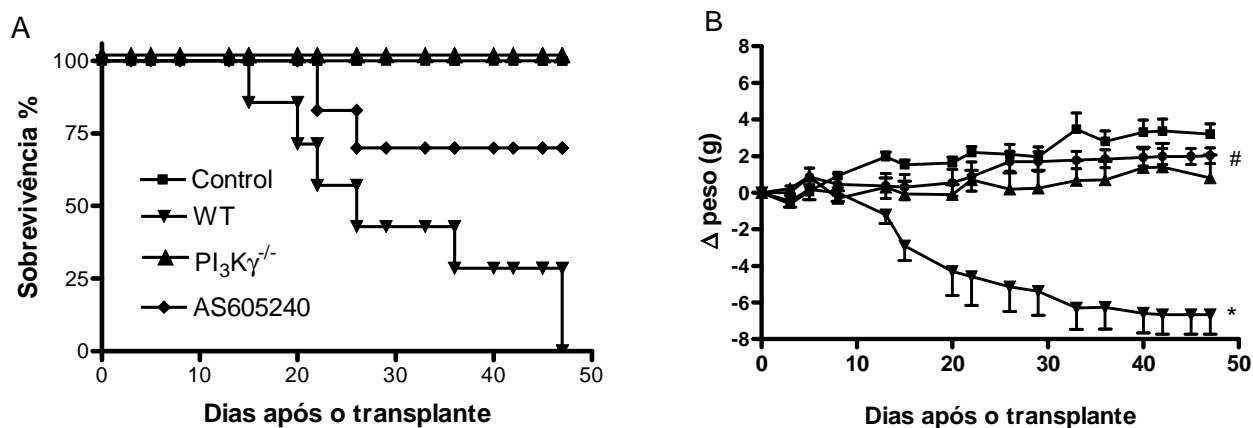


Figura 22 – Tratamento com evasina-1 reduziu a inflamação e os níveis de IFN- γ no fígado de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Evasina-1 foi administrada aos camundongos C57 selvagens 30 minutos antes do transplante e a cada 12 h. até o final do experimento. Após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e o fígado foi removido para análise patológica (A), análise do número relativo de macrófagos (B) e quantificação por ELISA da concentração de IFN- γ (C), 20 dias após o transplante. Resultados são apresentados como média \pm SEM *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD (n=6). D, E and F: Aspecto histológico do fígado de camundongos do grupo controle, GVHD e evasina-1, respectivamente. Escala 20 μ m.

Participação da via de sinalização intracelular através da enzima PI_3K_{γ} na GVHD

Após verificarmos o envolvimento do mediador inflamatório lipídico PAF e do mediador inflamatório protéico, quimiocina CCL3 na GVHD, iniciamos o estudo da via de sinalização ativada após interação destes dois mediadores com seus respectivos receptores, envolvendo a enzima PI_3K_{γ} . Para isso, foi realizado o transplante de células de camundongos C57 selvagens ou deficientes para o gene da enzima PI_3K_{γ} para camundongos F1. Após o transplante observamos que camundongos que receberam as células deficientes para PI_3K_{γ} apresentaram menor perda de peso e graduação clínica da doença e diminuição da mortalidade. O mesmo foi observado após o tratamento de camundongos submetidos à GVHD com um inibidor da enzima PI_3K_{γ} , AS605240 (Figura 23A-C). De maneira interessante, a ausência da PI_3K_{γ} nas células doadas também reverteu a diminuição do hematócrito observada em camundongos com GVHD (Figura 23D).



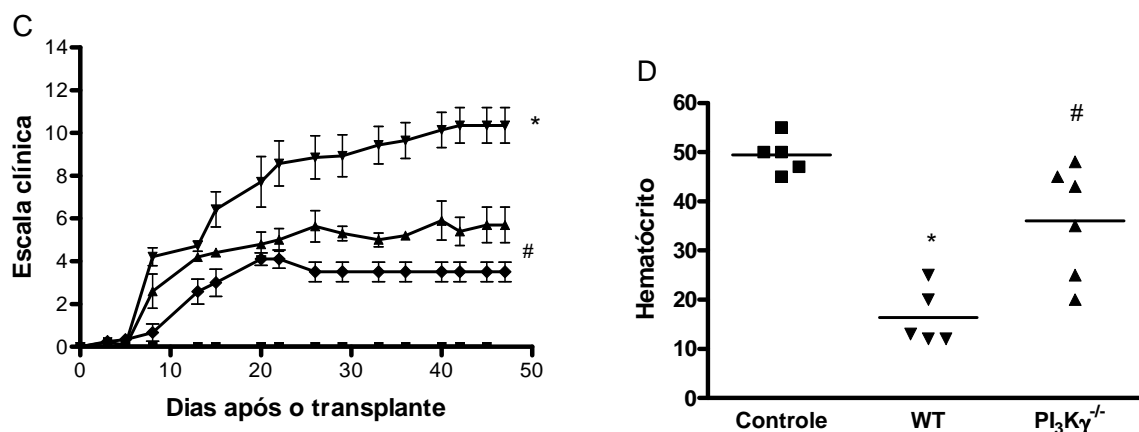


Figura 23 – Ausência da PI₃K_γ nas células doadas preveniu mortalidade e diminuiu a ocorrência dos sinais clínicos da GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PI₃K_γ^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Após a indução da doença camundongos foram monitorados a cada 2 dias para o controle da mortalidade (A), do peso corporal (B) da ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (C) e do hematócrito (D). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD, n=8.

Nos dias 3, 10 e 20 após o transplante os animais que receberam células deficientes no gene da PI₃K_γ apresentaram menos lesão no intestino com preservação da arquitetura do órgão e diminuição do infiltrado inflamatório (Figura 24A-C e 25C). Camundongos que receberam células selvagens desenvolveram uma extensa área de lesão com perda da arquitetura do órgão e acúmulo de células inflamatórias (Figura 24A-C e 25B). A lesão observada no fígado é mais tardia sendo mais bem caracterizada no vigésimo dia após o transplante em camundongos que recebem células selvagens (Figura 24D e 25E). Neste período camundongos que receberam células deficientes para o gene da PI₃K_γ tiveram diminuição do infiltrado inflamatório e melhor preservação do parênquima, comparados aos camundongos que receberam células selvagens (Figura 24D e 25F). Quando analisamos o conteúdo do infiltrado celular destes órgãos encontramos no intestino um número diminuído de células CD8⁺, CD4⁺ e CD11c⁺ (Figura 26A-C) e, também um menor número de macrófagos (número relativo de macrófagos/mg de intestino: grupo controle: 3.8 x10⁶ (±0.1) n=6; grupo que recebeu células selvagens: 15.4 x 10⁶ (±0.2) e grupo que recebeu células

$PI_3K\gamma^{-/-}$ $5.9 \times 10^6 (\pm 0.1)$; $n=8$ and $P < 0.05$). Já no fígado foi observado um menor número de macrófagos/mg de tecido e células $CD8^+$ por mm^2 de tecido em camundongos $PI_3K\gamma^{-/-}$ em relação aos camundongos que receberam células selvagens (Figura 27A-B).

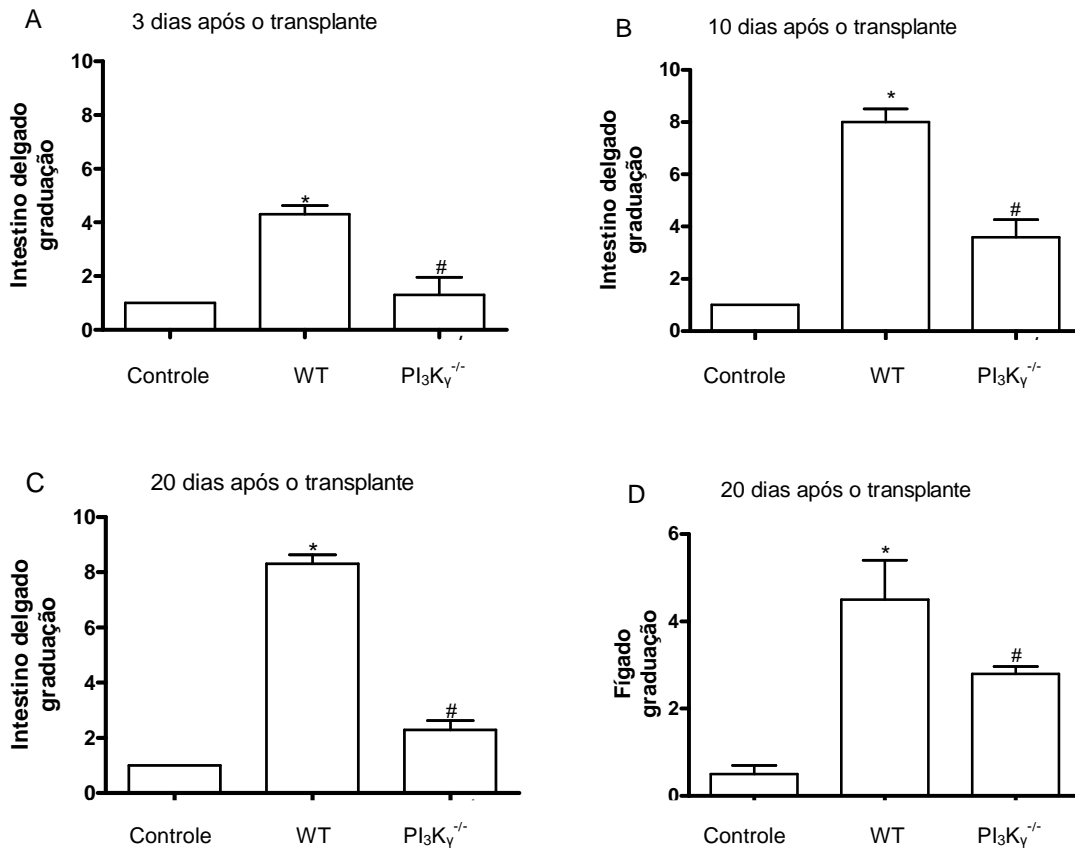


Figura 24 – Ausência da $PI_3K\gamma$ nas células doadas diminuiu a lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e amostras da porção jejuno-íleo do intestino delgado (A-C) e do fígado (D) foram coletadas para análise patológica nos dias 3, 10 e 20 após o transplante. Resultados são apresentados como média \pm SEM ($n=6$). * $P < 0.01$ comparado ao controle e # $P < 0.01$ comparado ao GVHD.

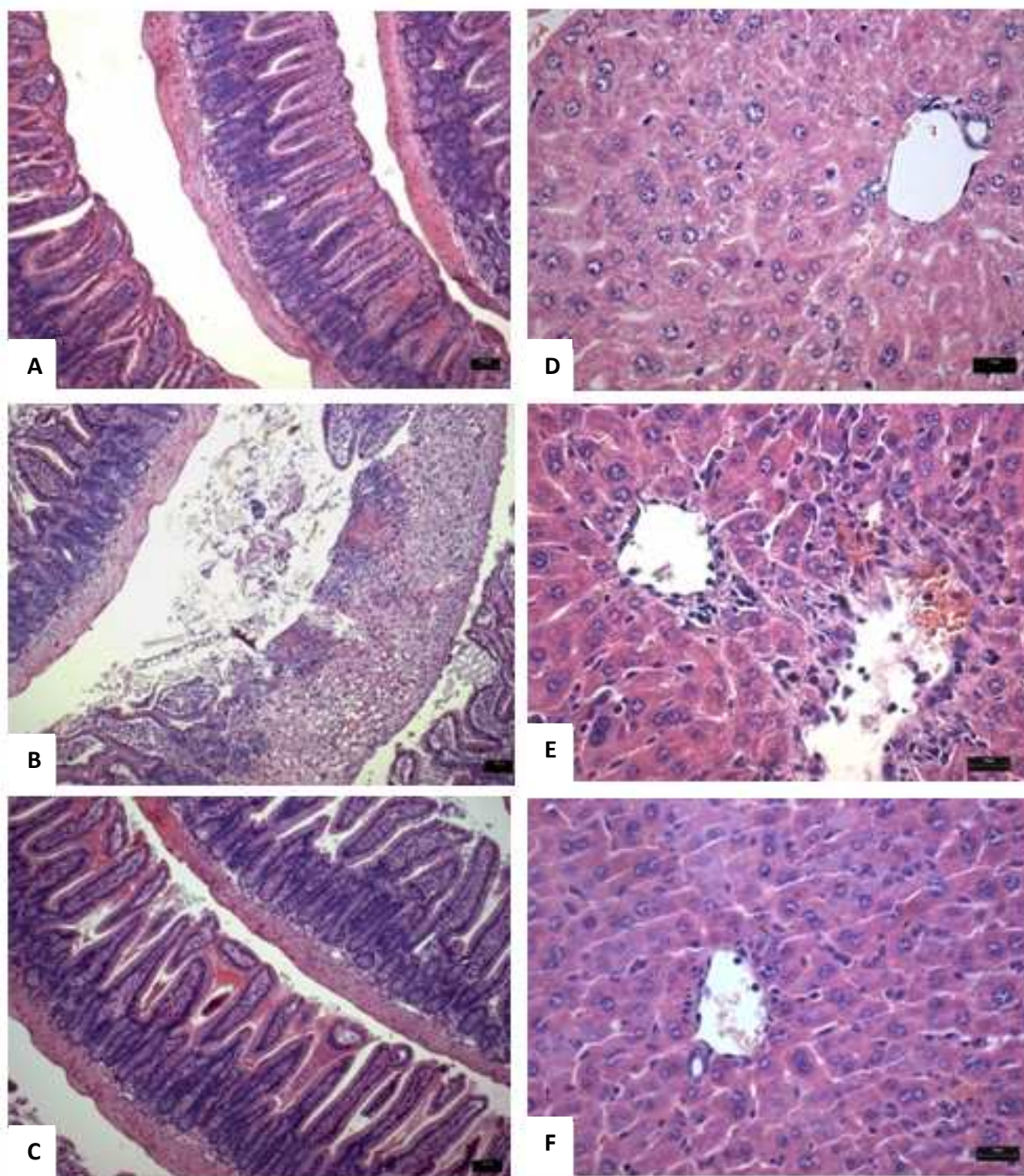


Figura 25 – Representação histológica do intestino e fígado dos grupos estudados no vigésimo dia após o transplante. Aspecto histológico do intestino delgado de camundongos do grupo controle (A), do grupo que recebeu células selvagens (WT) (B) e do grupo que recebeu células deficientes para a PI_3K_γ (C). Escala =100 μ m. Aspecto histológico do fígado de camundongos do grupo controle (D), do grupo que recebeu células selvagens (GVHD) (E) e do grupo que recebeu células deficientes para a PI_3K_γ (F) 20 dias após o transplante. Escala =20 μ m.

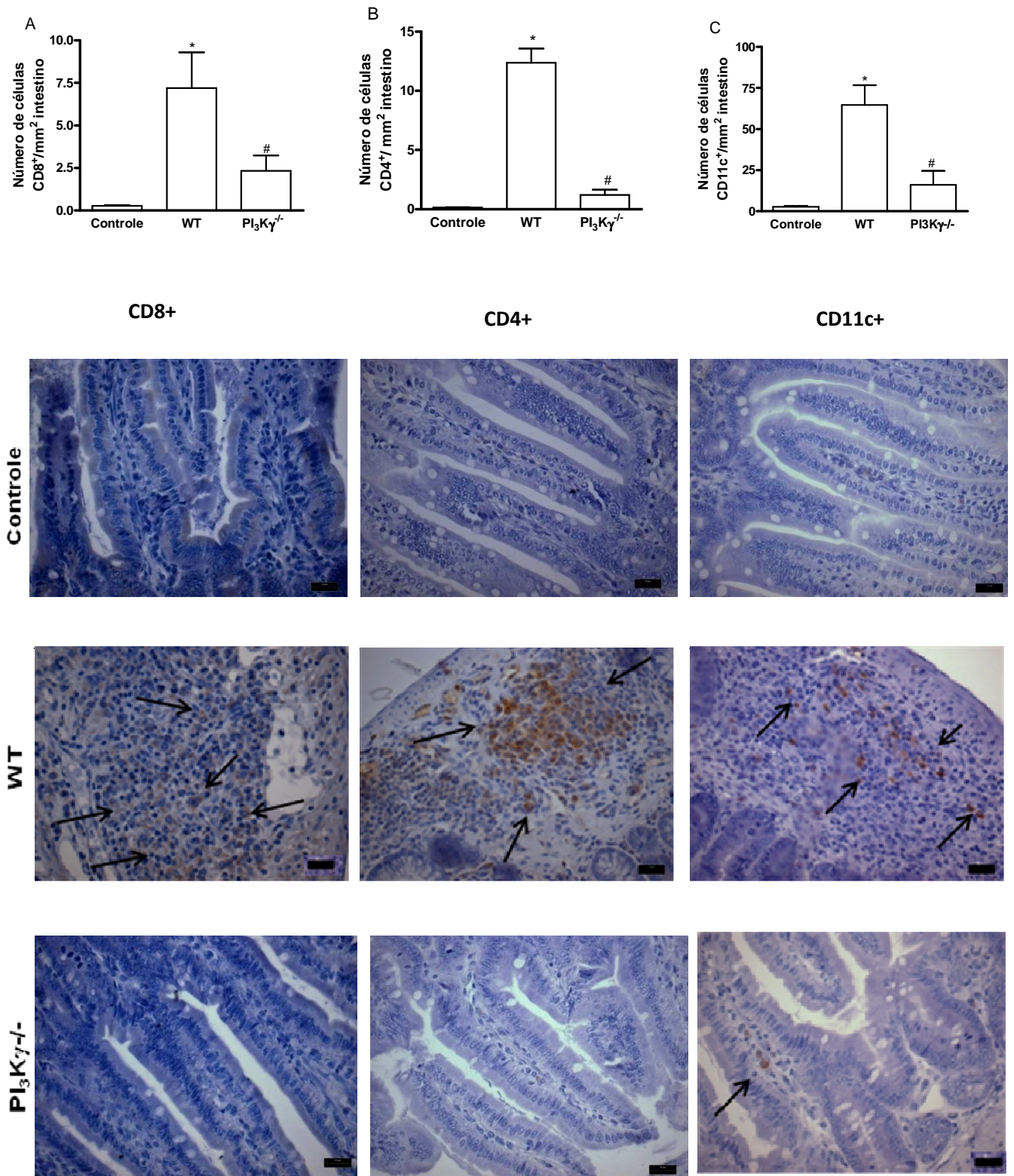


Figura 26 – Ausência da PI₃K γ nas células doadas diminuiu o número de células inflamatórias no intestino delgado de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PI₃K γ ^{-/-} para camundongos B6D2F1. 20 dias após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e o número de células CD8⁺ (A), CD4⁺ (B) e CD11c⁺ (C) no intestino foi quantificado através de imunohistoquímica. Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD. Escala = 20 μ m.

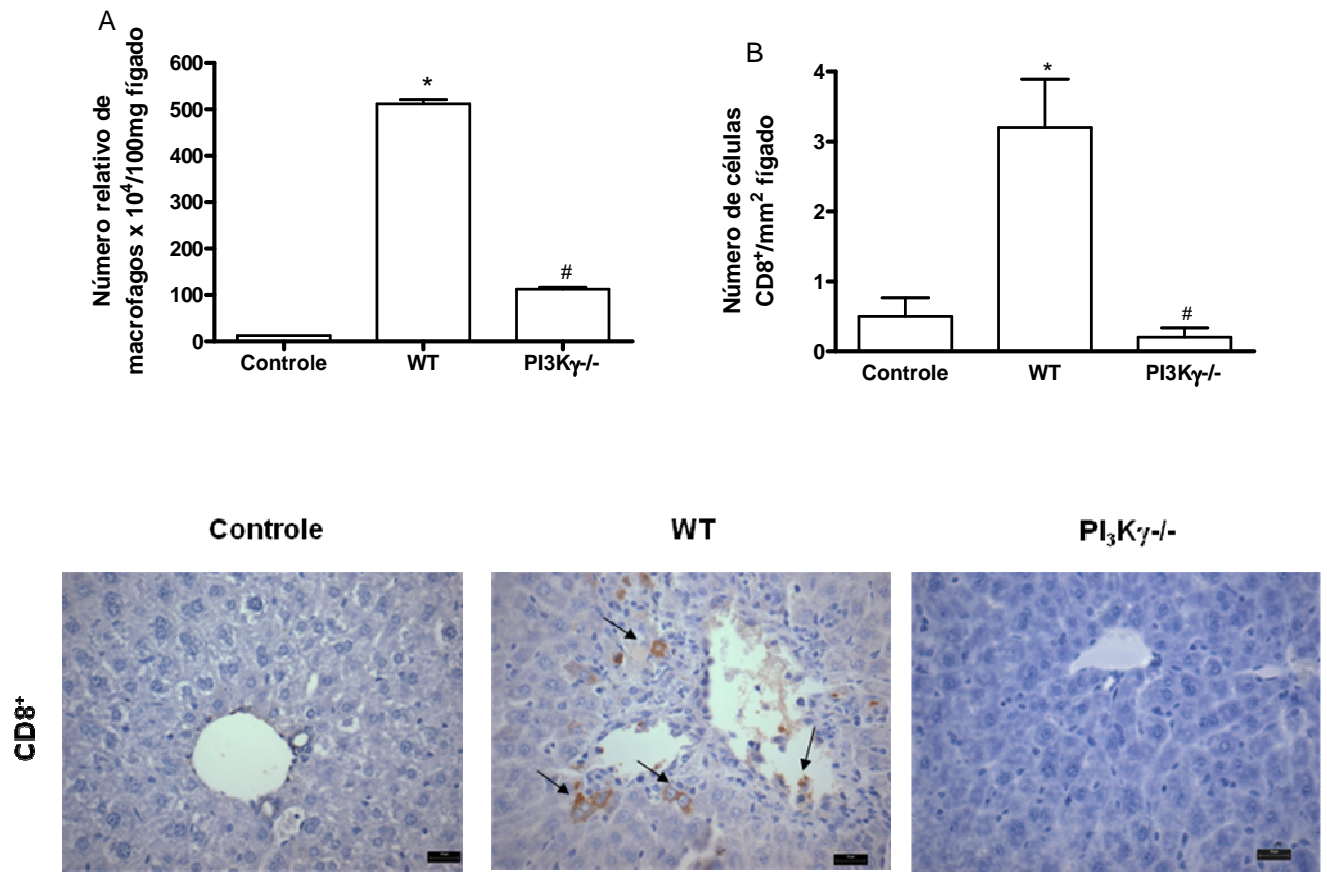


Figura 27 – Ausência da PI₃K γ nas células doadas diminuiu o número de células inflamatórias no fígado de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PI₃K γ ^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. 20 dias após a indução da doença os camundongos foram sacrificados e o número relativo de macrófagos (A) e o número de células CD8⁺ (B) no fígado foram quantificados através de imunohistoquímica. Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=6). *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD. Escala = 20 μ m.

De acordo com a menor lesão e a diminuição do infiltrado inflamatório intestinal a concentração das quimiocinas pró-inflamatórias CCL2, CCL3 e CCL5 no intestino também foi menor no grupo de camundongos que receberam esplenócitos PI₃K γ ^{-/-} nos três períodos analisados (Figura 28A-C). Além disso, a concentração das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , foi significativamente menor em camundongos que receberam células PI₃K γ ^{-/-} quando comparados aos que receberam células selvagens (Figura 28D-E).

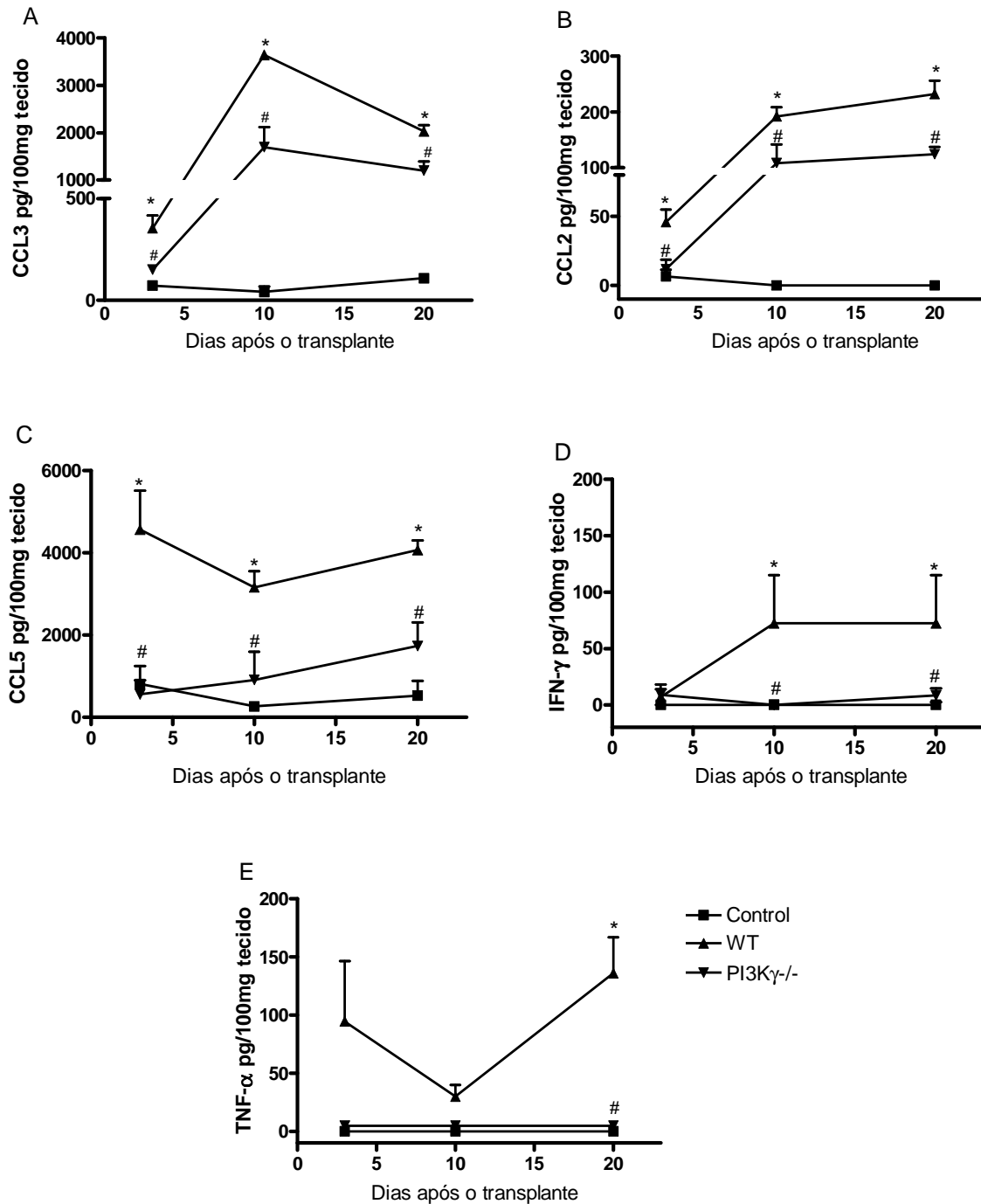


Figura 28 – Ausência da PI₃K γ nas células doadas reduziu a concentração de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT ou C57BL/6J-PI₃K γ ^{-/-} para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Nos dias 3, 10 e 20 após a indução da GVHD, camundongos foram sacrificados e a concentração de CCL3 (A), CCL2 (B), CCL5 (C), IFN- γ (D) e TNF- α (E) no intestino foram avaliados por ELISA. Resultados são apresentados como média \pm SEM. *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD n=6.

Ao investigarmos o mecanismo pelo qual PI_3K_γ poderia interferir no recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo, através da microscopia intravital de vênulas intestinais, observamos que camundongos tratados com um inibidor específico de PI_3K_γ , AS605240, 30 minutos antes da análise, tinham um número menor de células rolando e aderidas em relação aos camundongos tratados com veículo (Figura 29).

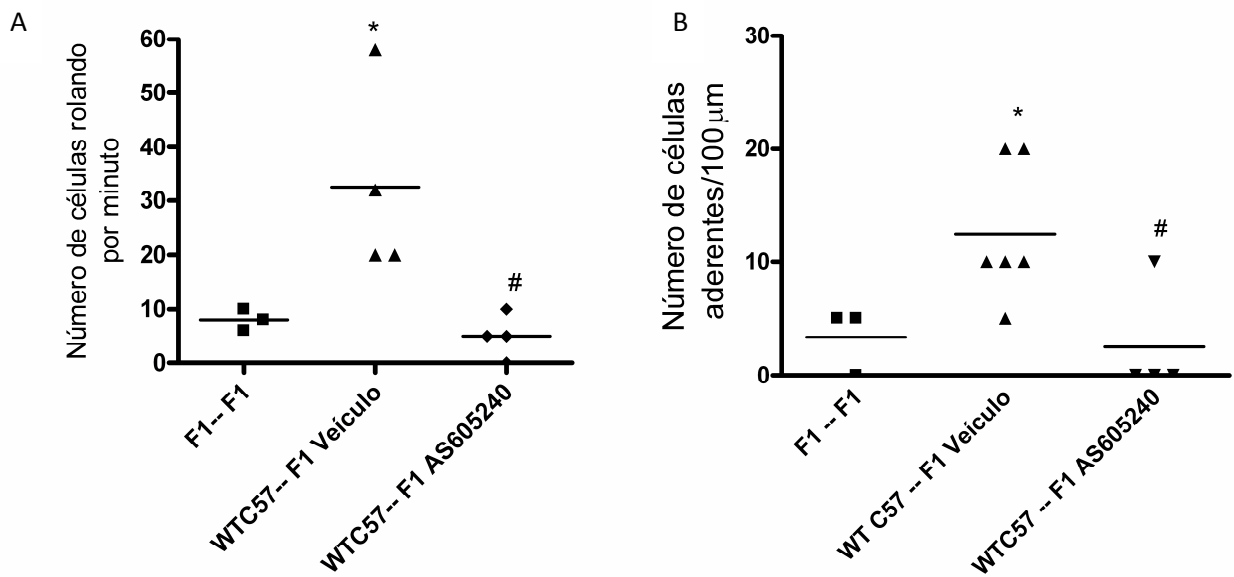


Figura 29 – Importância da enzima PI_3K_γ no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas intestinais de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos B6D2F1 não desenvolveram a doença e foram considerados o grupo controle do transplante. Um grupo recebeu uma única dose de AS605240 apenas 30 minutos antes da análise. E um grupo recebeu apenas PBS 1x autoclavado (veículo) em única dose 30 minutos antes da análise. No dia 20 após o transplante os camundongos foram anestesiados e vênulas intestinais foram selecionadas (20 a 40 μ m) para a análise do rolamento e a adesão dos leucócitos. Resultados são apresentados como média \pm SEM *P<0.01 comparado ao controle e #P<0.01 comparado ao GVHD (grupo controle n=6 e os outros grupos n=8).

Resposta do Enxerto-Versus-Tumor

Em humanos submetidos ao transplante de medula óssea as células transplantadas tornam-se ativadas contra o tumor remanescente da quimioterapia ou radioterapia (Weiden e cols. 1979, Horowitz e cols. 1990). A reação das células doadas contra o tumor remanescente é chamada de resposta do enxerto-versus-tumor (Johnson e cols. 1996). Desde a década de 80 modelos animais têm sido propostos a fim de se entender melhor essa reação (Pollard e cols. 1976). Nestes modelos é realizada uma injeção de células tumorais no mesmo dia do transplante de esplenócitos mimetizando o que ocorre em humanos (Teshima T. e cols., 1999, Cooke K. R. e cols. 2001, Krijanovski I. O, e cols. 1999).

Sendo assim, após verificado que as vias de modulação da resposta inflamatória aqui estudadas mostraram um relevante envolvimento na resposta inflamatória associada à GVHD, verificamos se a quimiocina CCL3, o receptor do PAF e a enzima PI_3K_γ poderia interferir na resposta do enxerto-versus-tumor. Para isso, camundongos B6D2F1 transplantados com células de camundongos C57 receberam seis mil células da linhagem P815 GFP⁺ logo após o transplante. Dez dias após o transplante linfonodos inguinais e mesentéricos foram retirados e analisados através de citometria de fluxo para quantificar o crescimento do tumor. No grupo de camundongos B6D2F1 que receberam transplante de camundongos B6D2F1 (grupo controle) e células tumorais, as células tumorais se proliferaram de forma significativamente maior do que o grupo que recebeu células de camundongos C57 (Figura 30). Nos camundongos B6D2F1 que receberam células C57 e tratamento com evasina-1 tiveram resultado similar ao observado em camundongos não tratados. O mesmo resultado foi observado ao transplantarmos esplenócitos deficientes para o PAFR ou para enzima PI_3K_γ não interferindo na resposta do enxerto-versus-tumor (Figura 30).

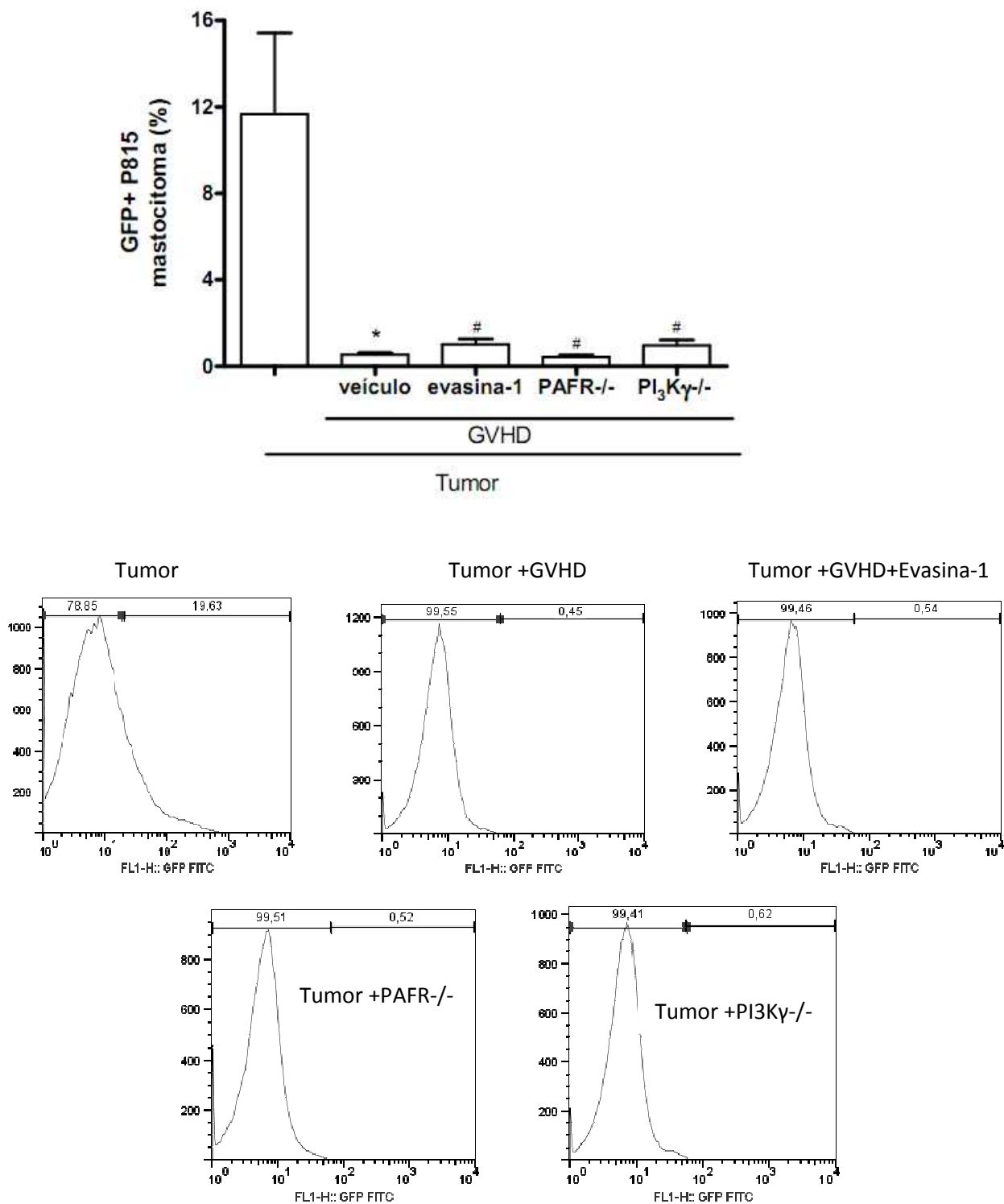


Figura 30 – Envolvimento da CCL3, do PAFR e da PI₃Kγ na resposta do enxerto-versus-tumor. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT, C57BL/6J-PAFR^{-/-} ou C57BL/6J-PI₃Kγ^{-/-} para camundongos B6D2F1. Células P815 GFP⁺ foram injetadas intravenosamente em camundongos B6D2F1 no mesmo dia da indução da GVHD. 10 dias após o transplante os camundongos foram mortos e a frequência das células P815GFP⁺ foi avaliada nos linfonodos inguinais e mesentéricos, através de uma análise de FACS. Resultados são apresentados como média ± SEM *P<0.01 comparado ao grupo que submetido à GVHD, mas que não recebeu células P815GFP⁺ e #P<0.01 quando comparados a camundongos que receberam células P815GFP⁺, mas não foram submetidos à GVHD.

DISCUSSÃO

É consenso entre vários autores que a GVHD é um problema antigo e até hoje permanece sem solução. O tratamento farmacológico padrão para a GVHD inclui o uso de altas doses de corticosteróides (Devetten e Vose, 2004; Ferrara e cols., 2006). No entanto, a taxa de sucesso desta terapia não é satisfatória (40%). Os pacientes que desenvolvem GVHD refratária a corticosteróides, têm um alto risco de morte, tanto por GVHD propriamente dita, quanto por infecções secundárias (Ferrara e cols., 2006). Devido à precariedade do tratamento atual, novas estratégias terapêuticas vêm sendo testadas, ao longo dos anos, com o objetivo de padronizar uma terapêutica adequada. Neste contexto, foram desenvolvidas terapias com anticorpos monoclonais para o receptor de IL-2 (daclizumab) e também para o TNF- α (entanercept) e seus precursores (infiximab) assim como, combinações de proteínas compostas por IL-2 humana mais toxina diftérica (denileukin diftitox) (Ferrara e cols., 2006, Devetten e Vose, 2004). Todas essas estratégias têm o objetivo de complementar a terapia com corticosteróide (Devetten e Vose, 2004). Entretanto, os resultados obtidos com esses tratamentos ainda não são satisfatórios. Portanto, a conclusão destes estudos é a mesma: é necessário aprofundar o entendimento na resposta inflamatória associada à GVHD, a fim de se obter modos mais eficazes de interferir na sua evolução ou até mesmo impedir o seu aparecimento. Sendo assim, o nosso estudo teve por objetivo elucidar o papel de dois importantes mediadores inflamatórios, PAF e CCL3, e da via de sinalização através da enzima PI_3K_γ , na doença do enxerto-versus-hospedeiro e verificar se a interferência farmacológica na ação desses mediadores ou da PI_3K_γ poderia trazer benefícios como uma forma de tratamento para a doença. Com essa finalidade utilizamos um modelo experimental de GVHD, anteriormente descrito na literatura, no qual a injeção de células de camundongos parentais C57BL/6J em camundongos B6D2F1, previamente irradiados, leva ao desencadeamento da GVHD aguda (Serody e

cols., 1999; Serody e cols., 2000; Tschetter e cols., 2000; El-Hayek e cols., 2005; Vodanovic-Jankovic e cols., 2006). Esse modelo experimental não tem como objetivo mimetizar o transplante de medula óssea realizado em pacientes como terapia para doenças malignas, e sim, mimetizar a reação que pode ocorrer após o transplante de medula óssea, na qual o enxerto se torna ativado e reage contra o hospedeiro, levando à lesão de diversos órgãos alvo do paciente podendo levar à morte.

Neste estudo demonstramos que a ausência de PAFR, CCL3, ou PI_3K_γ na célula doada ou o bloqueio farmacológico dessas moléculas em camundongos receptores levou a uma redução da GVHD, observada através da graduação dos sinais clínicos e diminuição da mortalidade, mostrando o envolvimento das mesmas na resposta inflamatória associada à doença.

O PAF é um importante mediador inflamatório lipídico que age através da ligação ao receptor PAFR participando da ativação e transmigração leucocitária e da produção de citocinas, agindo de maneira direta em respostas inflamatórias e imunes. O transplante de esplenócitos deficientes para o gene do receptor do PAF reduziu os sinais clínicos e histopatológicos da GVHD e preveniu a morte. O mesmo resultado foi observado ao administrarmos um antagonista para o receptor do PAF em camundongos submetidos à GVHD. De acordo com o descrito acima, órgãos alvo da GVHD, como o fígado e o intestino, apresentaram menos lesão e um menor número de células $CD8^+$. Células $CD8^+$ há muito tempo vem sendo descritas como as principais células efetoras envolvidas nas lesões dos órgãos alvo da GVHD (Korngold e cols. 1978, Piguet e cols. 1985, Guy e cols., 1986, Thiele e cols., 1989, Murai e cols., 1999, Backer e cols. 1996, Zhang e cols. 2000, EL-Hayek e cols., 2005). A ausência do PAFR nas células doadas não interferiu no infiltrado intestinal de células $CD4^+$ e $CD11c^+$ (dados não mostrados) que são células importantes na produção de mediadores inflamatórios, modulação da inflamação e apresentação de antígenos. Este

dado está de acordo com o dado da graduação clínica no qual ausência de PAFR nas células doadas foi eficaz em diminuir, mas não abolir a doença.

A migração de leucócitos é um dos principais mecanismos de lesão dos órgãos alvo da GVHD, interferindo de maneira direta na mortalidade associada à doença (Lu e cols. 2010, Ferrara e cols., 2005, 2006 e 2009, Wysocki e cols., 2005, Jaksch e Mattsson, 2005). Estudos prévios mostram a participação do PAFR no recrutamento de leucócitos para sítios inflamados (Souza e cols., 2000, Souza e cols., 2003, Klein e cols., 2002, Landgraf e cols., 2007). Em um modelo experimental de asma, o tratamento com o antagonista do receptor do PAF foi eficaz em diminuir o infiltrado de linfócitos (NK, CD4⁺, CD8⁺ e B) e eosinófilos no lavado bronco-alveolar (Landgraf e cols., 2007). Além disso, foi observado em camundongos deficientes no gene do receptor do PAF que o crescimento do tumor era cinco vezes maior que no animal selvagem devido à diminuição da resposta inflamatória contra o tumor (Ferreira e cols., 2007). Neste trabalho, através de uma análise da microvasculatura intestinal por microscopia intravital observamos que a ausência do PAFR nas células doadas ou o tratamento com antagonista do receptor do PAF diminuiu o rolamento e a adesão de leucócitos no endotélio. Isso poderia explicar o menor número de células inflamatórias encontradas nesse órgão e, conseqüentemente, a menor lesão tecidual. Alguns estudos já demonstraram o papel do PAFR no rolamento e adesão de leucócitos (Lorant e cols., 1993, Prescott e cols., 2000). A eficiência da interação dos leucócitos com o endotélio depende da ativação do PAFR presente no leucócito (Lorant e cols., 1993, Prescott e cols., 2000). Sendo assim, o uso do PCA ou a ausência do PAFR na célula doada poderia interferir na interação do leucócito com o endotélio influenciando na migração e acúmulo de leucócitos nos tecidos alvo da GVHD.

Adicionalmente, camundongos que receberam células deficientes para o receptor do PAF apresentaram redução nos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 no intestino.

CCL2, CCL3 e CCL5 são importantes quimiocinas que participam dos processos de ativação e recrutamento de leucócitos para sítios inflamados e estão associadas à lesão dos órgãos alvos na GVHD (Serody e cols. 1999 e 2000, Wysock e cols. 2005, Jaksch e Mattson 2005, Choi e cols. 2007, Bouazzaoui e cols. 2009). Sendo assim, os efeitos do PAF nos níveis de CCL2, CCL3 e CCL5 também podem ser relevantes para o desenvolvimento da GVHD em camundongos. Em nosso trabalho não foram investigados os mecanismos pelos quais o PAF interferiria na produção de CCL2, CCL3 e CCL5. Entretanto, PAF é importante para o recrutamento de células que produzem essas quimiocinas nos órgãos alvo da GVHD, tais como CD8⁺ e macrófagos. CCL2, CCL3 e CCL5 são quimiocinas quimioatraentes para células T e macrófagos com um perfil de ativação predominantemente Th1 e podem também serem liberadas por estes linfócitos (Choi e cols. 2005, Maurer 2004, Luther e cols. 2001, Lukacs e cols. 2000, Serody e cols. 2000 e 1999, Murai e cols. 1999, Ward e cols. 1998, Wong e cols. 1998, Kregner e cols. 1997, Schall e cols. 1990). Corroborando com a participação dessas células no GVHD, foi observada uma redução nos níveis de TNF α e IFN- γ no intestino e fígado de camundongos que receberam células deficientes para o PAFR. TNF α e IFN- γ participam de forma importante na patogênese da GVHD (Mowat 1989, Niederwieser e cols. 1990, Kregner e cols. 1997, Cooke e cols. 1998, Ellison e cols. 1998 e 2003, Wysocki e cols. 2005, Jaksch e Mattson e cols. 2005, El-Hayek e cols. 2005, Bouazzaoui e cols. 2009). Sendo assim, a diminuição de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias também podem contribuir para a proteção dos órgãos alvo e mortalidade associada à GVHD.

Outro achado interessante foi a menor concentração bacteriana encontrada na cavidade abdominal, no sangue e no fígado de camundongos que receberam células deficientes para o receptor do PAF. Esse dado se correlacionou com a menor destruição do intestino e possivelmente colaborou para a sobrevida apresentada por esses camundongos

A translocação bacteriana através da parede intestinal lesada é um importante agravante da GVHD podendo levar à sepse e morte (Jones e cols.1971, Beelen e cols.1992, Beelen e cols. 1999, Jenifer e cols. 2008).

Os resultados aqui descritos mostram que PAF é importante na resposta inflamatória associada à GVHD principalmente por interferir no recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo e por diminuir a concentração de quimiocinas e citocinas envolvidas na patogênese da doença.

Ausência de PAFR nas células doadas interferiu na concentração de CCL3 no intestino. Estudos prévios já mostraram a participação de CCL3 no desenvolvimento da GVHD em camundongos, mas não testaram estratégias que interferissem na sua ação durante o desenvolvimento da doença (Serody e cols., 1999 e 2000). Sendo assim, foi nosso objetivo avaliar o papel da CCL3 na resposta inflamatória associada à GVHD e testar a ação de uma proteína ligante de CCL3 como intervenção terapêutica para a doença.

Os resultados apresentados em nosso estudo mostram a relevância de CCL3 no desenvolvimento da GVHD em camundongos, confirmando estudos anteriores (Serody e cols. 1999 e 2000). De maneira inédita realizamos um tratamento com uma proteína ligante da quimiocina CCL3, denominada Evasina-1, a qual bloqueia a função desta quimiocina (Frauenschuhs e cols. 2007) amenizando os sinais clínicos da GVHD e prevenindo a morte. Tratamento com evasina-1 reduziu o número de leucócitos, especialmente CD8⁺, CD4⁺ no intestino delgado e macrófagos no intestino delgado e fígado de camundongos submetidos à GVHD, diminuindo a lesão destes órgãos. Um mecanismo que poderia explicar um menor influxo de leucócitos nos tecidos inflamados seria a inibição por evasina-1 da habilidade dos leucócitos em aderirem às células endoteliais nos tecidos afetados. Estes resultados sugerem que a participação na adesão de leucócitos seria o principal mecanismo pelo qual CCL3 atua na GVHD murina.

A produção da CCL3 atingiu um pico no dia 10 após a indução da doença, mas já se encontrava alta desde o terceiro dia e permaneceu alta até o vigésimo dia após o transplante, sugerindo que esta quimiocina é importante durante toda a evolução da doença. Experimentos no qual esplenócitos doados deficientes no gene da CCL3 foram utilizados mostraram que após a indução da GVHD, os níveis iniciais desta quimiocina dependiam das células do camundongo receptor, mas uma considerável proporção da produção de CCL3 dependia das células doadas nos dias 10 (> 80%) e 20 (> 95%) após o transplante. Sendo assim, as células doadas assumem um importante papel na produção de CCL3 durante a evolução da doença.

De acordo com estudos prévios (Serody e cols. 1999 e 2000) transferência de esplenócitos deficientes em CCL3 foi associada à diminuição dos sinais clínicos da GVHD e da mortalidade. Tratamento com evasina-1 resultou em proteção da doença e da morte de maneira similar ao observado quando usamos esplenócitos deficientes em CCL3 como fonte das células doadas. Evasina-1 é caracterizada pela sua alta afinidade por três quimiocinas da família CC: CCL3, CCL4 e CCL18 com Kd de 0,16; 0,81 e 3,21nM, respectivamente (Frauenschu e cols. 2007) e bloqueia de maneira eficaz a função da CCL3 *in vivo* (Deruaz e cols. 2008). É difícil determinar a contribuição da inibição de CCL4 e CCL18 para os efeitos benéficos da evasina-1 em nosso modelo de GVHD. Entretanto, as similaridades entre os efeitos do tratamento com evasina-1 e a transferência de esplenócitos deficientes no gene da CCL3 sugerem que a neutralização da CCL3 é o principal mecanismo pelo qual evasina-1 protege contra GVHD. Sendo assim, nossos resultados estão de acordo com os dados previamente publicados (Serody e cols. 1999 e 2000) nos quais CCL3 é importante para doença clínica e letalidade associadas à GVHD, e pela primeira vez mostram que terapias baseadas no bloqueio da CCL3 são eficazes no controle da doença em camundongos.

Experimentos foram então realizados a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais o bloqueio de CCL3, por evasina-1, poderia proteger camundongos submetidos à GVHD. Células CD8⁺, CD4⁺ e macrófagos são leucócitos que desempenham um papel efetor na GVHD (Thiele e cols. 1989, Murai e cols.1999, Serody e cols. 1999 e 2000, El-Hayek e cols. 2005, Jaksch e Mattson e cols. 2005). Em camundongos tratados com evasina-1 observamos significativa redução do número destes leucócitos no intestino. A inibição do recrutamento foi secundária à capacidade de evasina-1 interferir na adesão de leucócitos em vênulas do tecido inflamado, como demonstrado por microscopia intravital. Esse resultado sugere que CCL3 desempenha um importante papel na adesão e subsequente recrutamento de células inflamatórias para órgãos alvo da GVHD, como intestino. Além disso, camundongos tratados com evasina-1 apresentaram redução dos níveis de CCL5 no intestino. CCL5 é uma quimiocina importante para o recrutamento e proliferação de células T aloespecíficas na GVHD (Choi e cols. 2007). Sendo assim, os efeitos de evasina-1 nos níveis de CCL5 também podem ser relevantes para a diminuição do infiltrado celular nos órgãos alvo da GVHD. Em nosso trabalho não foram investigados os mecanismos pelos quais bloqueio de CCL3 levaria à inibição de CCL5. Mas CCL3 parece importante para o recrutamento de células que produzem CCL5 em órgãos alvo da GVHD, tais como CD4⁺ e CD8⁺. CCL5 é uma quimiocina quimioatraente para células T com um perfil de ativação predominantemente Th1e pode também ser liberada por estes linfócitos (Choi e cols. 2005, Lukacs e cols. 2000, Ward e cols. 1998, Schall e cols. 1990). De acordo com os estudos citados foi observada uma redução nos níveis de IFN- γ no intestino e fígado de camundongos tratados com evasina-1. IFN- γ participa de forma importante na patogênese da GVHD (Mowat 1989, Niederwieser e cols. 1990, Ellison e cols. 1998 e 2003). Os níveis reduzidos desta quimiocina também podem contribuir para a proteção dos órgãos alvo e mortalidade associada à GVHD. Adicionalmente, estudos têm mostrado um importante papel

do TNF- α na GVHD (Kregner e cols. 1997, Cooke e cols. 1998, Wysocki e cols. 2005, Jaksch e Mattson e cols. 2005, El-Hayek e cols. 2005, Bouazzaoui e cols. 2009). Também em nosso modelo, foi observado um aumento nos níveis de TNF- α , no intestino, após a indução da GVHD e o tratamento com evasina-1 não modificou esse achado (dados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com a eficácia da evasina-1 em diminuir mas não abolir a doença, como demonstrado nos estudos com PAF.

A interação de mediadores inflamatórios, como a CCL3 e o PAF, com seus receptores induz ativação de uma cascata de sinalização intracelular envolvendo a fosfatidilinositol-3-quinase gama (PI₃K γ), que tem um papel fundamental na migração de leucócitos para sítios inflamados (Hirsh e cols., 2000, Fruman e cols., 2002). Assim, um dos nossos objetivos foi investigar o papel desta enzima na resposta inflamatória associada à GVHD e se o seu bloqueio poderia ser uma estratégia terapêutica útil para o controle da doença.

Transplante de esplenócitos deficientes para PI₃K γ ou sua inibição foi acompanhada por uma significativa diminuição da GVHD, como demonstrado pela redução da mortalidade, sinais clínicos, lesão hepática e intestinal, translocação bacteriana e produção de citocinas pro-inflamatórias, comparados a camundongos que receberam células selvagens. Amenização da GVHD em camundongos que receberam esplenócitos deficientes para PI₃K γ foi associada com redução do influxo de leucócitos, incluindo macrófagos, células CD8⁺, CD4⁺ e CD11c⁺ no intestino delgado. Inibição do recrutamento de leucócitos foi associada com a redução de quimiocinas, incluindo CCL2, CCL3 e CCL5. Experimentos utilizando microscopia intravital também mostraram que PI₃K γ desempenha um papel direto no rolamento e adesão de leucócitos às células endoteliais dos tecidos afetados. Estes resultados sugerem que participação no recrutamento de leucócitos com subsequente acúmulo destas células nos órgãos afetados e aumento dos níveis de citocinas e

quimiocinas pro-inflamatórias são os mecanismos pelos quais $PI_3K\gamma$ participa da GVHD murina.

No presente estudo transferência de esplenócitos deficientes em $PI_3K\gamma$ foi associada à redução do infiltrado de macrófagos e linfócitos no intestino, diminuindo a lesão intestinal, a translocação bacteriana e a morte por GVHD. Estes resultados evidenciam o papel da $PI_3K\gamma$ presente nos leucócitos na patogênese da doença. Além disso, os resultados sugerem que a proteção observada em camundongos que receberam células deficientes para $PI_3K\gamma$ é relacionada à inibição do acúmulo dos leucócitos $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11c^+$ e macrófagos em órgãos alvo da doença.

Sendo assim, experimentos foram realizados a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais $PI_3K\gamma$ poderia interferir no recrutamento das células acima citadas para os locais de lesão associados à GVHD. No intestino de camundongos submetidos à GVHD, foi observada a redução dos níveis de CCL2, CCL3 e CCL5 quando as células doadas eram deficientes para $PI_3K\gamma$. Estas quimiocinas desempenham papel importante na GVHD por dirigir o recrutamento de células inflamatórias para os tecidos alvo (Serody e cols. 1999 e 2000, Wysock e cols. 2005, Jaksch e Mattson 2005, Choi e cols. 2007, Bouazzaoui e cols. 2009). Assim, a redução dos níveis dessas quimiocinas poderia contribuir para a redução do influxo de leucócitos para os locais de lesão na GVHD.

Alguns estudos mostraram o papel crucial de $PI_3K\gamma$ no rolamento e adesão de leucócitos à microvasculatura, observado através de microscopia intravital (Puri e cols., 2005, Pinho e cols., 2007, Liu e cols., 2007). Diminuição do rolamento e adesão leva conseqüentemente à redução da migração e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório. A ausência de $PI_3K\gamma$ nos leucócitos ou nas células endoteliais parece contribuir para a redução do rolamento e adesão dos leucócitos (Puri e cols., 2005, Liu e cols., 2007). Entretanto, a maioria dos estudos avalia o papel da $PI_3K\gamma$ no rolamento e adesão de neutrófilos (Puri e

cols., 2005, Pinho e cols. 2007, Liu e cols., 2007), que não é o principal tipo celular envolvido na GVHD (Wysock e cols. 2005 e Jaksch e Mattson 2005). Realmente, em nosso modelo não foi observado aumento de neutrófilos nos órgãos alvo da GVHD (dados não mostrados). Nós mostramos que na ausência de $PI_3K\gamma$, o recrutamento de células efetoras na GVHD é reduzido nos órgãos alvo.

Após visto a importância da CCL3, do PAF e da $PI_3K\gamma$ na resposta inflamatória associada à GVHD, seria interessante investigar se estas moléculas interferem na resposta das células doadas contra o tumor - resposta do enxerto-versus-tumor. Essa resposta é particularmente importante uma vez que o transplante de medula óssea é a terapia padrão para a leucemia e outros tipos de doenças malignas (Kolb e cols., 2008, Johnson e cols., 1996). As células doadas depois de ativadas desenvolvem uma resposta contra o tumor, eliminando as células tumorais remanescentes da quimioterapia ou radioterapia (Kolb e cols., 2008, Johnson e cols., 1996, Johnson e cols., 1992). Modelos animais têm sido usados no estudo da resposta do enxerto-versus-tumor considerando que, terapeuticamente, seria ideal um tratamento que conseguisse diminuir a reação do enxerto-versus-hospedeiro sem diminuir a reação do enxerto-versus-tumor (Johnson e cols., 1992, 1996 e 1999). Em nosso estudo, observamos uma significativa resposta do enxerto-versus-tumor após o transplante de esplenócitos, verificado pela inibição do crescimento de células P815-GFP+, que é uma linhagem de mastocitoma que se transforma em leucemia. De forma importante, tratamento com evasina-1 ou a ausência do PAFR ou da $PI_3K\gamma$ nas células doadas não afetaram a resposta do enxerto-versus-tumor, apesar de diminuírem a GVHD. Uma análise dos linfonodos e baço dos camundongos tratados com evasina-1 mostrou que este tratamento não interfere na chegada das células $CD8^+$ nesses órgãos, nem tão pouco na ativação dessas células (dados não mostrados). Sendo assim, evasina-1 diminui o recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo sem interferir na chegada dessas

células nos órgão linfóides, onde ocorre a reação do enxerto-versus-tumor. Esse mesmo mecanismo deve explicar a manutenção da reação do enxerto-versus-tumor em camundongos que receberam células deficientes para o PAFR e PI_3K_γ .

CONCLUSÃO

No presente estudo observamos que a ausência nas células doadoras ou o bloqueio do PAFR, da CCL3 e da PI_3K_γ protegeram camundongos submetidos à GVHD através da diminuição dos sinais clínicos e prevenção da morte. Essa proteção está ligada ao menor recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo e, conseqüentemente, diminuição da produção de mediadores inflamatórios importantes para a perpetuação da doença e destruição desses órgãos. Um possível mecanismo que explicaria o menor recrutamento de células inflamatórias para os órgãos alvo seria a interferência dessas moléculas nos processos de rolamento e adesão das células inflamatórias. De maneira importante, mostramos também que apesar de diminuir a resposta inflamatória associada à doença, o bloqueio da CCL3 ou a ausência do PAFR e da PI_3K_γ na célula doadora não interferiram na resposta do enxerto-versus-tumor, o que pode ser considerado para um futuro uso terapêutico para controlar o desenvolvimento da GVHD em humanos.

REFERÊNCIAS

- Alcázar I., Marqués M., Kumar A., Hirsch E., Wymann M., Carrera A. C., Barber D. F. Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med.* 2007, 204(12):2977-87.
- Arantes, R. M. E., and A. M. M. F. Nogueira. 1997. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res.* 290:61-69.
- Backer M.B., Altman N.H., Podack E.R., Levy R.B. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med.* 1996,.183:2645-2656.
- Ball L.M., Egeler R.M. On behalf of the EBMT Pediatric Working Party Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplantation.* 2008, 41, S58–S64.
- Baraliakos X., Braun J. Anti-TNF-alpha therapy with infliximab in spondyloarthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010, 6(1):9-19.
- Beelen, D. W., A, Elmaagacli., K. D. Muller, H. Hirche, and U. W. Schaefer. 1999. 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* 93:3267–75.
- Beelen, D. W., E. Haralambie, H. Brandt, G. Linzenmeier, K. D. Muller, K. Quabeck, H.G. Sayer, U. Graeven, H. K. Mahmoud and U. W. Schaefer. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992;80:2668–76.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., Mackay, C.R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.94, n.5, p.1925-30, 1997.
- Bonecchi, R., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Bernasconi, S., Locati, M., Power, C., Proudfoot, A., Wells, T.N., Mackay, C., Mantovani, A., Sozzani, S. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J. Immunol.* v.162, n.1, p.474-9, 1999.
- Bouazzaoui A., Spacenko E., Muller G., Miklos S., Huber E., Holler E., Andreesen R., Hildebrandt G.C. Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease. *Genes and Immunity.* 2009,10687-701.
- Cantley L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296,1655-1657.
- Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47(4):695-702.
- Charo I.F., Ransohoff R. M. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*, 2006, v.354, p.610-21.

Choi S.W., Hildebrandt G.C., Olkiewicz K.M., Hanauer D.A., Chaudhary M.N., Silva I.A., Rogers C.E., Deurloo D.T., Fisher J.M., Liu C., Adams D., Chensue S.W., Cooke K.R. CCR1:CCL5 (RANTES) receptor ligand interactions modulates allogeneic T cell responses and reduces graft-versus-host disease following stem cell transplantation. *Blood*. 2007, 110:3447–3455.

Cruikshank, W.W., Long, A., Tarpy, R.E., Kornfeld, H., Carroll, M.P., Teran, L., Holgate, S.T., Center, D.M. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, v.13, n.6, p.738-47, 1995.

Colson YL, Christopher K, Glickman J, Taylor KN, Wright R, Perkins DL. 2004. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood*. 104:3829-3835.

Condliffe A.M., Chilvers E.R., Haslett C., Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology*. 1996, 89, 105-111.

Cooke, K. R., Hill, G. R., Crawford, J. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.*, n. 102, p. 1882–91, 1998.

Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 2001;107(12):1581-9.

Curnock A.P., Logan M.K., Ward S. G. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology*. 2002,105:125-136.

Déruaz M., Frauenschuh A., Alessandri A.L., Dias J.M., Coelho F.M., Russo R.C., Ferreira B.R., Graham G.J., Shaw J.P., Wells T.N., Teixeira M.M., Power C.A., Proudfoot A.E. Ticks produce highly selective CBPs with antiinflammatory activity. *J Exp. Med*. 2008, 205:2019-31.

Devetten M.P., Vose J.M. Graft-versus-host disease: how to translate new insights into new therapeutic strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2004, 10: 815-825.

D'Haens G.R. Top-down therapy for IBD: rationale and requisite evidence. *Nat rev gastroenterol hepatol*. 2010. 7(2):86-92.

Ellison, C. A., Natuik, S. A., McIntosh, A. R., Scully, S. A., Danilenkos, D. M., Gartner, J. G. 2003. The role of interferon- γ , nitric oxide and lipopolysaccharide in intestinal graft-versus-host disease developing in F1- hybrid mice. *Immunology*. 109:440-449.

Ellison, C. A., Fischer, J. M. M., HayGlass, K. T., Gartner, J. G. 1998. Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN- γ gene knockout donors. *J Immunol*. 161:631-640.

El-Hayek J.M., Rogers T.E., Brown G.R. The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8⁺ T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. *J Leukocyte Biol*. 2005, 78:1001-1007.

Elsner, J., Mack, M., Bruhl, H., Dulkys, Y., Kimmig, D., Simmons, G., Clapham, P.R., Schlondorff, D., Kapp, A., Wells, T.N., Proudfoot, A.E. Differential activation of CC chemokine receptors by AOP-RANTES. *J. Biol. Chem*, v.275, n.11, p.7787-94, 2000.

Ferrara J. L. Deeg, H. J. Graft- versus host disease. *N. Engl. J. Med*. 1991, n.324: p. 667-74.

Ferrara J. L. M. Reddy, P. Pathophysiology of Graft-Versus-Host Disease. *Semin. Hematol.* 2006, 43(1):3-10.

Ferrara J. L. Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2007, 20: 91-97.

Ferrara J. L., Levine J. E., Reddy P., Holler E. Graft-versus-Host disease. *Lancet.* 2009, 373(9674):1550-61.

Ferrara, J. L. Yanilk, G. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2005. v. 5(3), n. 428, p.415-419.

Ferreira M.A.N.D., Barcelos L.S., Teixeira M.M., Bakhle Y.S., Andrade S.P. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptor for platelet activating factor (PAF). *Life Sciences.* 2007, 210-217.

Frauenschuh A., Power A.C., Déruaz M., Ferreira B., Teixeira M.M., Martin T., Wells T.N.C., Proudfoot A.E.I. Molecular Cloning and Characterization of a Highly Selective Chemokine-binding Protein from the Tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J Biol Chem.* 2007, 282:27250–27258.

Fruman D.A., Cantley L.C. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin. Immunol.* 2002,14:7-18.

Gaspar, M. C., Billing, J. S., Spriewald, M. B., Wood, K. J. Chemokine gene expression during allograft rejection: Comparison of two quantitative PCR techniques. *Journal of Immunological Methods*, v. 301, p. 41-52, 2005.

Gerard C., Rollins B. J. Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* 2001, v.2, n.2, p.108-15.

Gonzalez, M., Quezada, S. A., Blazar, B. R., Panoskaltis-Mortari, A., Rudensky, Y. A., Noelle, J. R. The balance between donor T cell anergy and suppression versus lethal Graft-versus-host disease is determined by host conditioning. *J. immunol.*, n.169, p. 5581-5589, 2002.

Granelli-Piperno, A., Moser, B., Pope, M., Chen, D., Wei, Y., Isdell, F., O'doherty, U., Paxton, W., Koup, R., Mojssov, S., Bhardwaj, N., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Steinman, R.M. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J. Exp. Med.*, v.184, n.6, p.2433-8, 1996.

Guy-Grand D., Vassalli P. Gut injury in mouse graft-versus-host reaction: study of its occurrence and mechanism. *J. Clin. invest.* 1986, 77:1584-1595.

Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Aug-Oct;13(4-5):413-21.

Hatano, Y., Katagiri, K., Takayasu, S. Increased levels in vivo of mRNAs for IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha), but not of RANTES mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis (AD). *Clin. Exp. Immunol*, v.117, n.2, p.237-43, 1999.

Hill, G. R., Crawford, J. M., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Pan, L., Ferrara, J. L. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*, n. 90, p. 3204–13, 1997.

- Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000. 287:1049–1053.
- Hoffman HM. Therapy of autoinflammatory syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1129-38; quiz 1139-40.
- Honda Z., Ishii S., Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem*. 2002,131(6):773-9.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozaman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 75:555-561.
- Howard, J. G., Woodruff, M. F. A. Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. Lond*, n. 154, p. 532-9, 1961.
- Ishii S. & Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res*. 2000, 39:41-82.
- Jacobsohn D.A. Novel therapeutics for the treatment of graft-versus-host disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002,11(9):1271-80.
- Jaksch M., Mattsson J. The pathophysiology of graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*. 2005, 61:398-409.
- Janeway, C. A. Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, n. 20, p. 197–216, 2002.
- Jennifer, L., M. D. Irani, S. Corey, M. D. Cutler, E. Edward, M. D. Whang. 2008. Severe Acute Gastrointestinal Graft-vs-Host Disease An Emerging Surgical Dilemma in Contemporary Cancer Care. *Arch Surg*. 143(11):1041-104.
- Johnson B. D., Truitt R. L. A decrease in graft-vs.-host disease without loss of graft-vs.-leukemia reactivity after MHC-matched bone marrow transplantation by selective depletion of donor NK cells in vivo. *Transplantation*. 1992, 54(1):104-12.
- Johnson B.D., Becker E. E., Truitt R. L. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 1999, 5: 123–132.
- Johnson B.D., Hanke C.A., Truitt R.L. The graft-versus-leukemia effect of post-transplant donor leukocyte infusion. *Leuk Lymphoma*. 1996, 23:1-9.
- Jones, J. M., R. Wilson, and P. M. Bealmeare. 1971. Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. *Radiat Res*. 45:577–88.
- Kapeller, R., and L. C. Cantley. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 16:565-576.
- Klein A., Pinho V., Alessandrini A.L., Shimizu T., Ishii S., Teixeira M.M. Platelet-activating factor drives eotaxin production in an allergic pleurisy in mice. *Br J Pharmacol*. 2002,135(5):1213-8.
- Kolb HJ. 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 112:4371-4379.

- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Mazarakis, D.D., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., Strieter, R.M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, v.93, n.3, p.921-8, 1994.
- Korngold B., Sprent J. Lethal graft-versus-host disease alter bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp med.* 1978, 148:1687-1698.
- Krenger W., Hill, G.R., Ferrara J.L. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1997, 27;64(4):553-8.
- Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Brinson YS, Ferrara JL. Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood.* 1999 15;94(2):825-31.
- Landgraf R.G., Nossi D.F., Sirois P., Jancar S. Prostaglandins, leukotrienes and PAF selectively modulate lymphocyte subset and eosinophil infiltration into the airways in murine model of asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007, 77:163-72
- Liu L., Puri K. D., Penninger J. M., Kubes P. Leukocyte phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphoinositide 3-kinase delta have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo. *Blood.* 2007. 15;110(4):1191-8.
- Lorant D. E., Topham M. K., Whatley R. E., McEver R. P. McIntyre T. M. Inflammatory Roles of P-Selectin. *J. Clin. Invest.* 1993.(92):559-570.
- Lu SX, Holland AM, Na IK, Terwey TH, Alpdogan O, Bautista JL, Smith OM, Suh D, King C, Kochman A, Hubbard VM, Rao UK, Yim N, Liu C, Laga AC, Murphy G, Jenq RR, Zakrzewski JL, Penack O, Dykstra L, Bampoe K, Perez L, Furie B, van den Brink MR. Absence of P-selectin in recipients of allogeneic bone marrow transplantation ameliorates experimental graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2010;185(3):1912-9.
- Lukacs, N. W. 2000. Migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues. *J Allergy Clin Immunol.*106:S264-9.
- Luther S.A., Cyster J.G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol,* 2001,v.2, n.2, p.102-7.
- Mackay C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol,* 2001, v.2, n.2, p.95-101,
- Mapara, M. Y., Leng, C., Kim, Y., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A., Sykes, M. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biology of blood and marrow transplantation,* n. 12, p. 623-634, 2006.
- Martin A.L., Schwartz M.D., Jameson S.C., Shimizu Y. Selective Regulation of CD8 Effector T Cell Migration by the p110 γ Isoform of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The J Immunology.* 2008, 2081-2088.
- Maurer, M., Von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.,* v.36, n.10, p.1882-6, 2004.
- McCluggage E.L.K, Scholtz J.M. Golimumab: a tumor necrosis factor alpha inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann pharmacother.* 2010. 44(1):135-44.

Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S. Martinez, A. C. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.*, n. 19, p. 397-421, 2001.

Melnikova V., Bar-Eli M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. *Cancer Metastasis Rev.* 2007. 26:359-371.

Mohty, M., et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, v. 106, n. 13, p. 4407-11, 2005

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

Murai M., Yoneyama H., Harada A., Vestergaard C., Guo B., Suzuki K., Asakura H., Matsushima K. Active participation of CCR5(+) CD8(+)T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 1999, 104:49-57.

Murai, M. Yoneyama, H. Ezaki T, e cols. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat. Immunol.*, n. 4, p. 154-160, 2003.

Murphy, P.M. international union of pharmacology, XXII: update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol*, n. 54, p. 227-229. 2002.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, v.52, n.1, p.145-76, 2000.

Niederwieser, D., Herold, M., Woloszczuk, W., Aulitzky, W., Meister, B., Tilg, H., Gastl, G., Bowden, R., Huber, C.1990. Endogenous IFN-gamma during human bone marrow transplantation. *Transplantation.* 50:620-625.

Piguet P.F. GVHR I elicited by products of class I or class II loci of the MHC: Analysis of the response of T mouse lymphocytes to of class I and II class products loci of the in MHC correlation with GVHR-induced mortality, medullary and aplasia, enteropathy. *J. Immunol.* 1985,135:1637-1643.

Pinho V., Russo R.C., Amaral F.A., Sousa L.P., Barsante M. M., Souza D.G., Alves-Filho J.C., Cara D.C., Hayflick J.S., Rommel C., Ruckle T., Rossi A.G., Teixeira M.M. Tissue and stimulus dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *J. Immunol.* 2007,1;179(11):7891.

Pollard M, Truitt RL, Ashman RB. 1976. Mouse leukemia and solid tumors treated with bone marrow grafting. *Transplant Proc.* 8(4):565-7.

Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M., McIntyre T.M. Platelet-Activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69:419-45.

Puri K.D., Doggett T.A., Huang C.Y., Douangpanya J., Hayflick J. S., Turner M., Penninger J., Diacovo T. G. The role of endothelial phosphoinositide 3-kinase gamma activity in neutrophil trafficking. *Blood.* 2005, 106(1): 150–157.

Rickert P., Weiner O.D., Wang F. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.* 2000,10:466-73.

Rollins, B. J. Chemokines. *Blood*, n. 90, p. 909-928, 1997.

Sasaki T.J., Irie-Sasaki R. G., Jones A. J., Oliveira-dos-Santos A.J., Stanford W.L., Bolon B., Wakeham A., Itie A., Bouchard D., Kozieradzki I., Joza N., Mak T., Ohashi P., Suzuki A., Penninger J.M. Function of phosphoinositide 3-kinase gamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 2000, 287:1040-1046.

Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., Goeddel, D. V. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*.347:669-671.

Serody J.S., Burkett S.E., Panoskaltis-Mortari A., Ng-Cashin J., McMahon E., Matsushima G.R., Lira S.A., Cook D.N., Blazar B.R. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to recruitment of CD8+ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood*. 2000, 96:2973-2980.

Serody J.S., Cook D.N., Kirby S.L., Reap E., Shea T.C., Frelinger J.A. Murine T lymphocytes incapable of producing macrophage inhibitory protein- 1 α are impaired in causing graft-versus-host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier. *Blood*. 1999, 93:43-50.

Servant G., Weiner O.D., Herzmark P. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*. 2000, 11;287(5455):1037-40.

Sfikakis P.P. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:180-210. 2010.

Sluijs K.F, Elden L.J.R, Nijhuis M., Schuurman R., Florquin S., Shimizu T., Ishii S., Jansen H.M., Lutter R., Poll T. Involvement of platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006, 12:2005.

Souza D.G., Cara D.C., Cassali G.D., Coutinho S.F., Silveira M.R., Andrade S.P., Poole S., Teixeira M.M. Effects of the PAF receptor antagonist UK 74505 on local and remote reperfusion injuries following ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol*. 2000, (131)1800-1808.

Souza D.G., Pinho V., Soares A.C., Shimizu T., Ishii S., Teixeira M.M. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *British Journal of Pharmacology*. 2003, 139, 733–740.

Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Kunkel, S.L., Lynch, J.P. 3rd, Burdick, M.D., Gilbert, A.R., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Strieter, R.M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J. Immunol*, v.151, n.5, p.2852-63, 1993.

Terwey T. H., Kim T. D. Kochman A. A., Hubbard V. M., Lu S., Zakrzewski J. L. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*. 2005, 106:3322–3330.

Teshima T, Hill GR, Pan L, Brinson YS, van den Brink MR, Cooke KR, Ferrara JL. IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1999;104(3):317-25.

- Thiele D.L., Eigenbrodt M.L., Bryde S.E., Eigenbrodt E.H., Lipsky P.E. Intestinal Graft-versus-Host Disease Is Initiated by Donor T Cells Distinct from Classic Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1989, 84:1947-1956.
- Tschetter J. R., Mozes E., Shearer G. M., Progression from acute to chronic disease in murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 2000, (165) 5987-5994.
- Tseng, S.Y., Dustin, M.L. T-cell activation: a multidimensional sig-naling network. *Curr. Opin. Cell Biol.*, n. 14, p. 575–80, 2002.
- Turner L., Ward S.G., Westwick J. RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J. Immunol.* 1995, 155(5):2437-44.
- Turner SJ, Domin J, Waterfield MD, Ward SG, Westwick J. The CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25987-95.
- Van Assche G., Vermeire S., Rutgeerts P. The potential for disease modification in Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010, 7(2):79-85.
- Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp.Cell Res.* 1999, 253:239-254.
- Venkiteshwaran A. Tocilizumab. *MAbs.* 2009,1(5):432-8
- Vicente-Manzanares M., Rey M., Jones D.R. The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J. Immunol.* 1999, 1;163(7):4001-12.
- Vodanovic-Jankovic S., Hari P., Jacobs P., Komorowski R. Drobyski W. R. NF-Kb as target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. *Blood,* 2006, 107(2) 827-34.
- Ward, S. G., and F. M. Marelli-Berg. 2009. Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J.* 15:418(1):13-27.
- Ward, S. G., Bacon, K., Westwick, J. 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity.*9:1-11.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R.1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 300:1068-1073.
- Weijer S., Leemans J.C., Florquin S., Shimizu T., Ishii S. Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 2003,109, 552-556.
- Will A., Wynn R. Diagnosis of acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006,81:505-506.
- Wong, M., Fish, E.N. RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J. Biol. Chem,* v.273, n.1, p.309-14, 1998.
- Wysocki C.A., Panoskalsis-Mortari A., Blazar B.R., Serody J.S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood.* 2005, 105:4191-4199.

Xun, C. Q., Thompson, J. S., Jennings, C. D., Brown, S. A., Widmer, M. B. Effect of total irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2- incompatible transplanted SCID mice. *Blood*, n. 83, p. 2360-7, 1994.

Zhang Z.X., Yang L., Young K., Du Temple B., Zang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanisms of suppression. *Nat Med*. 2000,6:389-400.

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](#)