

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**LITHOTHAMNION MUELLERI REGULA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA,
LESÃO DE ÓRGÃOS ALVO E LETALIDADE NA DOENÇA DO
ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO**

Belo Horizonte

2012

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**LITHOTHAMNION MUELLERI REGULA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA,
LESÃO DE ÓRGÃOS ALVO E LETALIDADE NA DOENÇA DO
ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO**

Barbara Maximino Rezende

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

**Co-orientadora: Dra. Marina Gomes Miranda e
Castor Romero**

Belo Horizonte

2012

“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino.”

Antoine de Saint-Exupery

Dedico este trabalho a Deus, abundante em graça e em fidelidade.

Aos meus pais e irmãs, exemplos de amor e união.

Ao William, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos a mim concedidas e pelo conforto e acalento nos momentos mais difíceis. Sem o Seu amor eu nada seria.

À professora Vanessa Pinho pela disponibilidade em me receber como iniciação científica e me orientar quando eu ainda era uma menina, encantada com suas aulas de citologia e histologia. Foi o vídeo do rolamento de leucócitos que você levou para aula na graduação que me “recrutou” para o laboratório! Obrigada pela ampla orientação nesta transição entre graduanda, iniciação científica, enfermeira e mestranda.

À Marina Castor, uma das pessoas mais lindas que conheço, pela orientação, atenção, escuta e sabedoria me oferecidas em todos esses 5 anos de convivência. Este trabalho não seria possível se você não estivesse ao meu lado. Obrigada por tudo!

Aos professores Mauro Teixeira e Danielle Souza pelas contribuições ao longo deste trabalho e de tantos outros, porque “Conhecer não é demonstrar nem explicar, é aceder à visão”.

À professora Lirlândia Pires, por me fazer conhecer a ciência realizada em suas mais perfeitas técnicas e cuidado. O tempo que trabalhei com você foi fundamental para me tornar uma aluna melhor.

Ao professor Fernão e seus alunos, sempre tão disponíveis, pelo fornecimento das frações polissacarídicas da *Lithothamnion muelleri*, essencial para a realização deste estudo.

Ao professor Flávio Amaral pelo acolhimento nos meus primeiros dias de iniciação científica, me ensinando técnicas e introduzindo conceitos de imunologia muito úteis para o restante de minha vida acadêmica.

Ao grupo Imunofarmacologia, em especial à Angélica, Caio, Cris, Lívia Barroso, Fred e tantos outros que contribuíram direta ou indiretamente com o trabalho, participando dos experimentos ou me ensinando as técnicas dos mesmos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia celular que me permitiu mais esta conquista.

Aos meus amados amigos e companheiros de laboratório que riram e choraram tantas vezes comigo: Alesandra, Albená, Carol, Denise, Débora, Fernando e Laís. É um prazer trabalhar com vocês!

À minha amiga e parceira inseparável no estudo da GVHD, Priscila Teles, pelos finais de semana e madrugadas cedidos para a realização de experimentos e pela amizade sincera. “Nós vamos dominar o mundo”!

Aos meus amigos do hospital: Dani, Natália, Felipe e Amanda que estão sempre torcendo pelo meu sucesso e me oferecendo palavras de incentivo nos momentos de maior cansaço.

Aos meus pais pelos “cafezinhos” oferecidos nas árduas madrugadas de estudo e pela compreensão da minha presença às vezes tão ausente devida ao acúmulo de tarefas a serem realizadas. Sem o apoio incondicional de vocês eu não teria chegado até aqui!

Às minhas irmãs pelo incentivo ao estudo e também ao descanso quando percebiam que eu já não estava aguentando mais. Vocês tornam a minha caminhada mais leve!

Ao William, sempre tão orgulhoso de mim! O seu amor me tornou uma pessoa melhor e pensar em nosso futuro juntos é o que me impulsiona a prosseguir nesta caminhada em busca da realização de meus sonhos!

À indústria Phosther Algamar LTDA pelo fornecimento da alga *Lithothamnion muelleri* utilizada neste trabalho.

Ao CDTN pela irradiação dos camundongos.

Aos agentes financiadores deste projeto: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELA	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1) INTRODUÇÃO	15
2) JUSTIFICATIVA	26
3) OBJETIVOS	28
3.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4) MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1) Animais.....	30
4.2) Alga <i>Lithothamnion muelleri</i>	30
4.3) Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda.....	30
4.3.1 Modelo de irradiação parcial	30
4.3.2 Modelo de irradiação total	31
4.4) Tratamentos utilizados.....	34
4.5) Avaliação dos parâmetros clínicos	34
4.6) Análise Histopatológica.....	37
4.7) Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD	38
4.8) Quantificação de muco intestinal (coloração por Ácido Periódico de Schiff)	41
4.9) Quantificação de citocinas e quimiocinas	42
4.10) Quantificação do infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)	43
4.11) Quantificação do infiltrado de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO)	44
4.12) Análise do recrutamento celular através de Microscopia Intravital.....	44
4.13) Translocação bacteriana.....	45
4.14) Dosagem de creatinina sérica.....	46
4.15) Avaliação da resposta do enxerto contra o tumor (graft versus tumor ou GVT)...	46

4.16)	Análise Estatística.....	46
5)	RESULTADOS.....	47
5.1)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz sinais clínicos e mortalidade em camundongos submetidos à GVHD	47
5.2)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD	52
5.3)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no intestino e fígado de camundongos submetidos à GVHD... ..	58
5.4)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz o acúmulo de macrófagos no intestino e fígado de camundongos submetidos à GVHD	61
5.5)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> inibe a interação de células endoteliais e leucócitos na microvasculatura intestinal de camundongos submetidos à GVHD	63
5.6)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz translocação bacteriana no intestino, fígado e sangue de camundongos submetidos à GVHD.....	65
5.7)	Carbonato de cálcio não está envolvido com a proteção de camundongos submetidos à GVHD e tratados com <i>Lithothamnion muelleri</i>	67
5.8)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz os níveis de IFN- γ e CCL2 no cérebro de camundongos submetidos à GVHD.....	68
5.9)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> reduz os níveis de creatinina sérica de camundongos submetidos à GVHD	69
5.10)	Tratamento com <i>Lithothamnion muelleri</i> mantém o efeito do enxerto-versus-tumor (GVT) após indução da GVHD	71
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONCLUSÃO	85
8.	REFERÊNCIAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata geral da GVHD aguda.	19
Figura 2. Indução da GVHD (modelo de irradiação parcial).....	33
Figura 3. Indução da GVHD (modelo de irradiação total).....	33
Figura 4. Preparação dos intestinos para confecção de lâminas histológicas em forma de rocambole.....	38
Figura 5. Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do intestino	40
Figura 6. Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado.....	41
Figura 7. Tratamento com LM protege camundongos submetidos à GVHD de maneira dose dependente	49
Figura 8. Tratamento com LM protege da GVHD.....	50
Figura 9. Tratamento com LM protege os camundongos em um modelo mais grave de GVHD	51
Figura 10. Efeito do tratamento com LM na graduação histopatológica intestinal no 3° e 10° dia após o transplante	55
Figura 11. Tratamento com LM reduz lesão intestinal em camundongos submetidos à GVHD	56
Figura 12. Tratamento com LM reduz lesão hepática em camundongos submetidos à GVHD	57
Figura 13. Tratamento com LM reduz a concentração intestinal de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD	59
Figura 14. Tratamento com LM reduz a concentração hepática de citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD	60
Figura 15. Tratamento com LM inibe o acúmulo de macrófagos em órgãos alvo da GVHD .	62
Figura 16. Tratamento com uma fração polissacarídica de LM diminui o rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura mesentérica de camundongos submetidos à GVHD.....	64
Figura 17. Tratamento com LM inibe translocação bacteriana no intestino, fígado e sangue de animais submetidos à GVHD.....	66
Figura 18. Carbonato de cálcio (CaCO ₃) não está envolvido na proteção de camundongos submetidos à GVHD e tratados com LM	67
Figura 19. Tratamento com LM reduz a concentração de IFN- γ e CCL2 no cérebro de animais submetidos à GVHD	69
Figura 20. Tratamento com LM preserva a função renal de camundongos submetidos à GVHD	70
Figura 21. Tratamento com LM não interfere na GVT em camundongos submetidos à GVHD.....	72

LISTA DE TABELA

Tabela 01 – Agentes terapêuticos que vêm sendo utilizados em estudos clínicos para prevenção ou tratamento da GVHD e seus principais efeitos	24
Tabela 02 – Escala clínica.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs: células apresentadoras de antígenos

ATB: antibiótico

CaCO₃: carbonato de cálcio

CAM: Medicina alternativa e complementar

CCl₄: Tetraclorido de carbono

CDTN: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CFU: Unidade Formadora de Colônia

Co⁶⁰: cobalto ⁶⁰

CYP2E1: Isoforma do citocromo P450

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)

FP: Fração polissacarídica da alga *Lithothamnion muelleri*

GVHD (Graft-versus-host disease): Doença do enxerto-versus-hospedeiro

GVT (Graft-versus-tumor response): Resposta do enxerto-versus-tumor

Gy: Gray, unidade de medida radioativa correspondente a 100 rads.

HLA : Antígenos de Histocompatibilidade Principal

i.v.: intravenosa

i.p.: intraperitoneal

IFN- γ : Interferon gama

H & E: Hematoxilina e Eosina

HSCT: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

LM: *Lithothamnion muelleri*

MHC (Major Histocompatibility Complex): Complexo de Histocompatibilidade Principal

miHag (Minor histocompatibility antigen): antígenos de histocompatibilidade menor

MPO: mieloperoxidase

NAG: n-acetilglicosaminidase

NK: Células Natural Killer

NKT: Células Natural Killer T

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PAS: Ácido Periódico de Schiff

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

Th1: “célula T helper 1”

TGI: trato gastrointestinal

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

TCH: transplante de células tronco hematopoiéticas

RESUMO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) é a principal complicação do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCH) limitando o sucesso desta terapia e ocorre quando linfócitos do doador (presentes nas células enxertadas) são ativados em resposta a antígenos do indivíduo receptor (denominado hospedeiro). Uma cascata inflamatória que envolve a produção de citocinas e quimiocinas e resulta na expressão aumentada de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e moléculas coestimulatórias nas células apresentadoras de antígenos (APCs), também está envolvida na patogênese da GVHD. Subsequentemente ao transplante, células T do doador são ativadas através do reconhecimento de aloantígenos do hospedeiro e se diferenciam em células T efetoras que migram para os órgãos alvo da doença, recrutam outros leucócitos e aumentam a resposta inflamatória local e sistêmica. Esta intensa inflamação é responsável pela destruição dos órgãos alvo da GVHD, principalmente do intestino e do fígado, que pode culminar com a morte do hospedeiro. Entretanto, os linfócitos doados ativados são importantes para a eliminação da doença remanescente, reação denominada resposta do enxerto versus tumor (GVT). Por isso, torna-se relevante o desenvolvimento de terapias que reduzam a GVHD sem interferir na GVT. *Lithothamnion muelleri* (LM), uma alga marinha vermelha, e extratos minerais obtidos de algas do gênero *Lithothamnion*, foram capazes de reduzir a inflamação associada a pólipos gastrointestinais e lesão hepática. Além disso, estudos revelaram que algas da mesma classe que LM apresentam propriedades anti-inflamatórias, antitumoral e atividade imunomodulatória. Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos do tratamento com a alga *Lithothamnion muelleri* na patogênese da GVHD aguda, utilizando um modelo de transplante semi-alogênico, através da doação de esplenócitos de camundongos WT para camundongos B6D2F1 previamente irradiados. LM nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 1% foi oferecida na dieta do grupo denominado LM um dia antes do transplante e mantida até o final dos experimentos. Para preparo desta dieta, foram misturados 100 g de ração triturada com LM nas concentrações a serem testadas (0,1%, 0,3% ou 1% de LM) em 60 ml de água filtrada. Após a realização deste experimento de dose resposta, o grupo LM foi tratado com LM na concentração de 1% (melhor dose testada) em todos os experimentos subsequentes. O grupo GVHD recebeu apenas a ração triturada misturada em água filtrada (a cada 100 g de ração foram adicionados 60 ml de água filtrada). O tratamento com a fração polissacarídica (FP) da alga também foi realizado para análise do recrutamento celular por microscopia intravital: os camundongos foram tratados por via endovenosa com uma única dose de 200 μ l de veículo (PBS-5% etanol) ou FP (100 mg/kg em PBS-5% etanol), 30 minutos antes do experimento. Camundongos tratados com LM mostraram reduzida mortalidade e sinais clínicos da doença quando comparados a camundongos não tratados. Estes resultados foram associados à menor lesão de órgãos alvo, diminuição na produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (CCL3, IFN- γ , TNF- α , CCL2 e CCL5), redução do recrutamento de leucócitos e menor translocação bacteriana do intestino, fígado e sangue. Além disso, animais tratados com LM não apresentaram alteração nos níveis de creatinina plasmática sugerindo preservação da função renal e apresentaram menores níveis de IFN- γ e CCL2 cerebrais. Observamos ainda que o tratamento com LM não alterou o efeito benéfico do enxerto-versus-tumor. Em conclusão, LM se destaca como nova candidata com potencial aplicação terapêutica no tratamento da GVHD.

ABSTRACT

Graft-versus-host disease (GVHD) is the greatest complication limiting the clinical utility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), in which lymphocytes of donors (graft) are activated in response to host antigen. An inflammatory cascade involving cytokine/chemokine production resulting in enhanced expression of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules on tissue antigen-presenting cells (APCs) is also involved in the GVHD pathogenesis. Subsequently to the transplant donor T cells become activated through recognition of host alloantigens and differentiate into effector T cells that migrate to target organs, recruit other leukocytes and lead to local and systemic inflammation. *Lithothamnion muelleri* (LM) is a marine red algae with anti-inflammatory properties. Moreover, mineral-rich extracts obtained from LM have been shown to reduce the inflammation associated to gastrointestinal polyps and studies revealed that polysaccharides from alga from same class as the LM have antiinflammatory properties, antitumor and immunomodulatory activity. The present study evaluated the effects of treatment with the algae *Lithothamnion muelleri* in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease (GVHD), using a model of adoptive transfer of splenocytes from WT to B6D2F1 mice. The engraftment process may also cause a graft versus tumor response which is useful for controlling residual malignant diseases, eliminating tumor cells. Therefore, therapies that reduce GVHD without interfering in GVT are important. Mice treated with LM showed reduced mortality and clinical signs of disease when compared to untreated mice. These findings were associated with lower target organ damage, decreased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (CCL-3, IFN- γ , TNF- α , CCL-2 and CCL-5), reduction of leucocyte recruitment and lower bacterial translocation into the intestine, liver and blood. Moreover, animals treated with LM showed no change in plasma creatinine levels (suggesting preservation of renal function) and decreased levels of IFN- γ and CCL-2 in brain. We also observed that the treatment with LM did not alter the beneficial effect of graft-versus-tumor. In conclusion, LM appears as a new candidate with potential therapeutic application in the treatment of GVHD.

1) INTRODUÇÃO

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

O transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas é uma terapia comumente utilizada no tratamento de doenças hematológicas e não hematológicas, imunodeficiências e tumores sólidos (Krenger, 1997., Ferrara e cols., 2009; Pasquini, 2010). A principal complicação relacionada a esta terapia é a doença do enxerto-versus-hospedeiro ou graft-versus-host disease (GVHD), uma desordem imunológica que causa alta morbidade e é responsável pela morte de 15 a 40% dos pacientes que recebem transplantes hematológicos (Ferrara e cols., 2009; Pasquini, 2010).

A GVHD ocorre quando os linfócitos T contidos no transplante reconhecem disparidades antigênicas entre o doador e o receptor (Ball e cols., 2008), ocasionando a resposta dessas células alogênicas a diferentes órgãos como a pele, fígado e intestino, sendo estes órgãos denominados como órgãos alvo da doença (Goker e cols., 2001; Ferrara e cols., 2009; Robb & Hill, 2012). O rim e o cérebro são também outros órgãos que podem ser afetados pela GVHD (Siegal e cols., 2007; Abboud e cols., 2012).

A GVHD pode ser definida em aguda e crônica (Will & Wynn, 2006; Ferrara e cols., 2007). A GVHD aguda ocorre até 100 dias após o transplante, sendo mais comum a sua ocorrência no período de duas a seis semanas após o transplante e caracteriza-se por morte de células epiteliais do trato gastrointestinal, da pele e do fígado. As lesões nestes órgãos trazem manifestações clínicas como exantema, hemorragia do trato gastrointestinal, diarreia e icterícia (Will e Wynn, 2006, Ferrara e cols., 2007; Shlomchik, 2007). Já a GVHD crônica ocorre após 100 dias de transplante e é semelhante a uma doença auto-imune. É caracterizada

por fibrose e atrofia dos órgãos alvo, podendo danificar também os pulmões (Shlomchik, 2007).

O desenvolvimento e a gravidade da GVHD em receptores de transplantes dependem de diferentes fatores, o que torna complexa a etiologia desta doença. Dos fatores etiológicos relacionados ao doador e ao receptor, o mais importante é a diferença entre os antígenos de histocompatibilidade maior e menor – HLA e miHag. Quanto maior for o grau de compatibilidade entre o doador e o receptor menor é o risco de desenvolver GVHD (Ferrara e cols., 2005; Ferrara e cols., 2007). A diferença de sexo entre doador e receptor é também um fator que pode ser considerado devido às diferenças entre o complexo de histocompatibilidade menor entre o homem e a mulher (Ferrara e cols., 2005). A idade do receptor é outra variável importante, sendo que indivíduos mais velhos têm maior risco de desenvolvimento da doença (cerca de 20% dos indivíduos de até 20 anos submetidos a transplante de medula óssea experimentam GVHD aguda e indivíduos com mais de 50 anos têm 80% de chance de desenvolvê-la) (Ferrara e cols., 2005; Ferrara e cols., 2007; Blazar e cols., 2012). O regime de condicionamento do paciente para o transplante, a fonte do enxerto hematopoiético e a profilaxia utilizada antes do transplante também podem favorecer a ocorrência da GVHD (Ferrara e cols., 2005; Blazar e cols., 2012). O regime de condicionamento leva à lesão dos órgãos alvo e liberação de citocinas pró-inflamatórias que desempenham papel importante no desencadeamento da GVHD (Jaksch & Mattsson, 2005; Mapara e cols., 2006; Choi e cols., 2010; Kittan & Hildebrandt, 2010; Blazar e cols., 2012). Quanto à fonte do enxerto hematopoiético, células derivadas do cordão umbilical, que são imaturas e menos funcionais, estão associadas a um menor desenvolvimento GVHD do que células tronco do sangue (Ferrara e cols., 2005; Blazar e cols., 2012).

A profilaxia da GVHD, que consiste geralmente na administração endovenosa de ciclosporina A associada ou não ao metrotexato e à prednisona (drogas imunossupressoras) no dia anterior ao transplante e mantida por até 3 meses, também tem influência no risco para o desenvolvimento da GVHD. Baixas doses destes imunossupressores associa-se à maior incidência da GVHD, uma vez que a ausência de um tratamento agressivo permite o aparecimento de sintomas brandos da doença que podem progredir conseqüentemente para a sua forma grave (Devergie & Janin, 1999; Blazar e cols., 2012).

O desenvolvimento da GVHD aguda pode ser dividido em três diferentes fases. Na fase inicial, o regime de condicionamento, realizado através da quimioterapia e/ou radioterapia com o objetivo de imunossuprimir o receptor, eliminar células tumorais e evitar a rejeição do enxerto, causa destruição tecidual e ativação de células apresentadoras de antígeno (Mapara e cols., 2006). Uma vez ativadas, estas células aumentam a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior e moléculas co-estimulatórias potencializando a sua função imunológica (Serody e cols., 2000; Jaksch & Mattsson, 2005, Ferrara e cols, 2009; Blazar e cols., 2012). Outras células do sistema imune inato são também ativadas através da translocação de bactérias a partir do intestino lesado (exposição ao lipopolissacarídeo ou LPS), por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e também por quimiocinas, o que contribui para um maior dano tecidual e grande liberação de citocinas, caracterizando a primeira fase da doença (Hill e cols., 1997; Cooke e cols., 2001; Murai e cols., 2003; Blazar e cols., 2012). A segunda fase da GVHD ou fase de ativação se inicia subsequentemente ao transplante, quando ocorre a interação das células T doadas com as células apresentadoras de antígenos do hospedeiro, promovendo uma liberação ainda maior de citocinas que intensificam a apresentação de antígenos, levando à ativação e diferenciação das células T em células T citotóxicas efetoras (Jaksch & Mattsson, 2005; Blazar e cols., 2012). Na fase final, conhecida como fase efetora, estas células T ativadas utilizam de mecanismos mediados por

perforinas, granzimas e Fas (molécula indutora de apoptose) e liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios que agem principalmente no recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo, podendo levar o paciente à morte caso não sejam utilizadas terapias eficazes de controle para reduzir a intensa resposta inflamatória gerada (Figura 1) (Serody e cols., 2000; Wysocki e cols., 2005; Blazar e cols., 2012).

Apesar das lesões da GVHD acometerem todos os órgãos alvo da doença, evidências clínicas e experimentais sugerem que o trato gastrointestinal é o principal órgão relacionado à fisiopatologia da GVHD, participando da amplificação da doença a nível sistêmico (Hill & Ferrara, 2000). Lipopolissacarídeo é um constituinte das bactérias da microbiota intestinal com papel importante na patogênese da GVHD, uma vez que é um potente estimulador da produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-12 que são importantes mediadores da GVHD clínica e experimental, além de causar a ativação de macrófagos, células que contribuem na fisiopatologia da doença (Hill & Ferrara, 2000). O LPS pode ser detectado no fígado de camundongos com GVHD a partir do 2º dia após o transplante e um pouco mais tarde no sangue, período em que o animal começa a sucumbir à doença. A translocação de endotoxina entérica para a circulação sistêmica leva à sepse e é causada por lesões que comprometem a barreira formada pelas células do epitélio intestinal (Ellison e cols., 2003). A sepse é uma das principais causas de morte de pacientes que desenvolvem GVHD e por isso, antibióticos que eliminam bactérias gram-negativas e outros agentes capazes de modificar a microbiota intestinal vêm sendo utilizados no tratamento da doença (Jones e cols.1971; Beelen e cols.1992; Beelen e cols. 1999; Irani e cols. 2008).

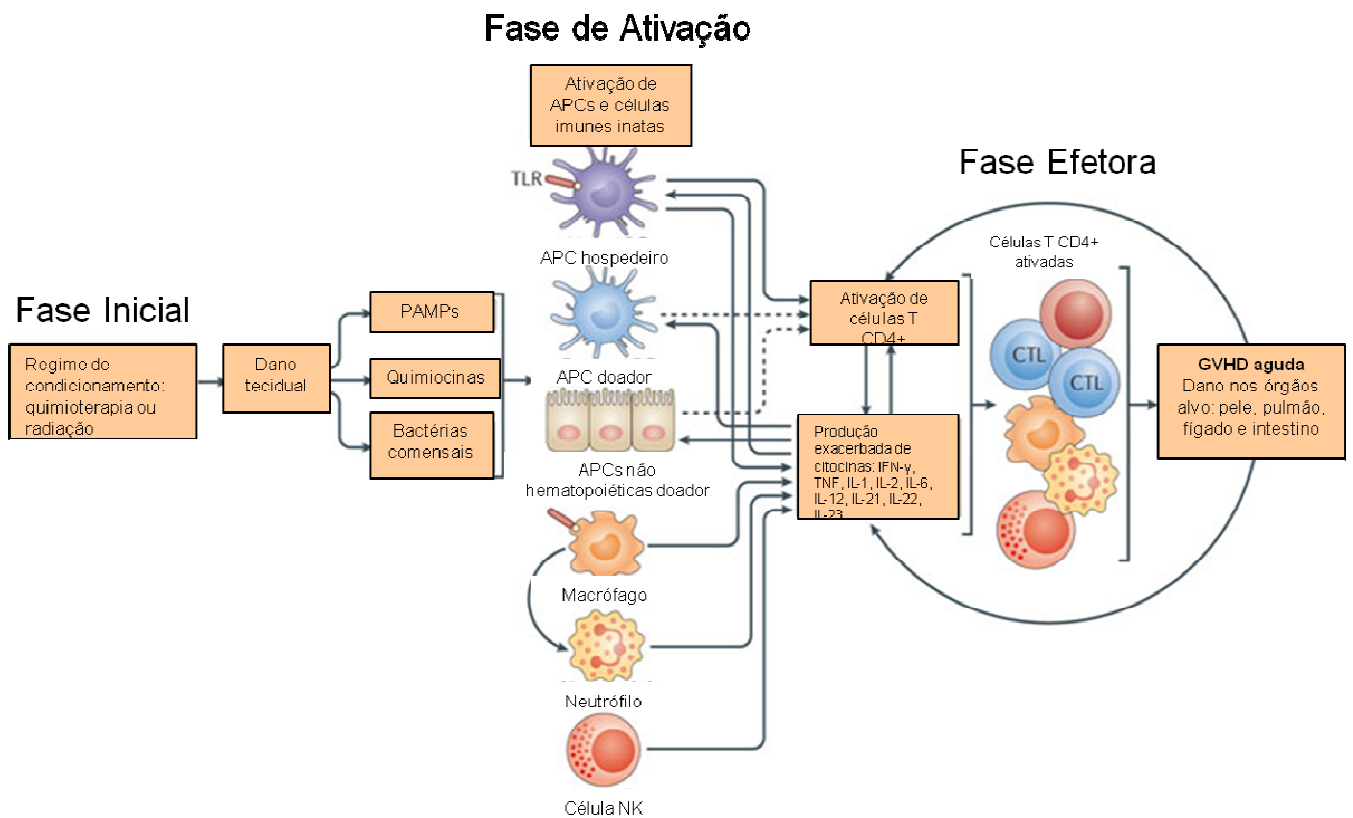


Figura 1. Cascata geral da GVHD aguda. Diferentes fases da doença do enxerto-versus-hospedeiro podem ser observadas. A fase inicial é caracterizada pelo regime de condicionamento que gera a lesão tecidual inicial. Posteriormente, na segunda fase da doença ou fase de ativação, ocorre o recrutamento de células do sistema imune inato, ativação de células T e liberação de quimiocinas e citocinas. Na fase final ou fase efetora, as células T ativadas se diferenciam em linfócitos T citotóxicos que liberam mediadores inflamatórios e provocam o recrutamento de leucócitos para os órgãos alvo da doença, perpetuando a resposta inflamatória (modificada de Blazar e cols., 2012).

Apesar dos efeitos prejudiciais relacionados à resposta imune exacerbada que ocorre na GVHD, células ativadas do doador são essenciais para a eliminação de células tumorais remanescentes da quimioterapia ou radioterapia, ocasionando uma resposta benéfica denominada de resposta do enxerto-versus-tumor ou graft-versus-tumor (GVT) (Weiden e cols. 1979, Horowitz e cols. 1990; Johnson e cols. 1996). Desde a década de 80, modelos animais têm sido propostos para entender melhor esta resposta (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 (Krijanovski e cols. 1999; Teshima e cols., 1999; Cooke e cols. 2001).

Modelos experimentais da GVHD

Embora existam diferenças entre a GVHD em humanos e a GVHD experimental, modelos da doença em animais vêm sendo utilizados desde a década de 70 e são úteis para o entendimento dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória associada à doença e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o controle da mesma (Howard & Woodruff, 1961).

Os modelos mais relevantes de GVHD aguda em camundongos envolvem o transplante de esplenócitos e / ou células da medula óssea e podem variar dependendo da dose de irradiação utilizada para a ablação de células imunes do receptor. Modelos que utilizam a irradiação corporal total, referidos como regime de condicionamento mieloablativos, exigem a reconstituição do sistema imune com a infusão de células precursoras da medula óssea (Schroeder & DiPersio, 2011; Castor e cols., 2012a). Geralmente, uma dose de $5-10 \times 10^6$ células é suficiente para reconstituir a medula óssea e assegurar a sobrevivência dos camundongos (Schroeder & DiPersio, 2011; Castor e cols., 2012a). Quando a medula óssea não apresenta uma reconstituição adequada, ocorre imunossupressão grave nos animais, podendo levá-los à morte. Nos primeiros dias após o transplante de medula óssea, os camundongos apresentam uma população mista de células do doador e do receptor no sangue periférico. Já após 7 dias do transplante, observa-se uma substituição completa das células hematopoiéticas do receptor pelas células do doador (Schroeder & DiPersio, 2011; Castor e

cols., 2012a). Quando se utiliza a irradiação parcial (denominado de regime de condicionamento não-mieloablativo) não é necessária a reconstituição total da medula óssea. Após o transplante, os camundongos demonstram um quimerismo, onde a maioria de suas células é proveniente do doador (Schroeder & DiPersio, 2011; Castor e cols., 2012a). Os modelos que utilizam a irradiação corporal total associada ao transplante de células da medula óssea e esplenócitos provocam uma doença mais grave nos camundongos em comparação aos modelos que utilizam irradiação corporal parcial associada ao transplante de esplenócitos, uma vez que a dose de irradiação é proporcional ao grau de dano tecidual e subsequente produção de citocinas observada no regime de condicionamento, o que influencia no desenvolvimento da GVHD (Schroeder & DiPersio, 2011). Neste trabalho, escolhemos um dos modelos animais propostos para o estudo da GVHD para a realização da maioria dos experimentos e 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) (El-Hayek e cols., 2005; Vodanovic e cols., 2006; Castor e cols., 2010; Castor e cols., 2011). Um segundo modelo, responsável pelo desencadeamento da GVHD mais grave foi utilizado apenas para confirmar os efeitos da alga *L. muelleri* na doença, onde foi realizado o regime de condicionamento mieloablativo e transplante de esplenócitos associados a células da medula óssea do camundongo C57BL/6 para o B6D2F1.

Terapias utilizadas na prevenção ou tratamento da GVHD

Fármacos esteróides como metilprednisolona ou prednisona são a primeira linha de tratamento para a GVHD, uma vez que têm amplos efeitos anti-inflamatórios e linfocitotóxicos (Westin e cols., 2011; Martin e cols., 2012). Entretanto, pacientes com GVHD refratária a esteróides apresentam alto risco de mortalidade pela doença ou de suas

complicações e não existe um tratamento padrão para estes pacientes. Tanto a gravidade quanto a duração das manifestações da doença com o uso de glicocorticóides devem ser consideradas para conclusão de que esta terapia de primeira linha não está controlando a GVHD de forma adequada (Martin e cols., 2012). A opção pela terapia de segunda linha deve ser feita o mais rápido possível para os pacientes com GVHD grave e é a única alternativa para pacientes que não toleram altas doses de corticosteróides devido a seus efeitos colaterais como hiperglicemia, hipertensão, osteopenia, miopatia e insuficiência renal. (Martin e cols., 2012). Entretanto, ainda não existem critérios e indicações sistemáticas para a escolha do agente terapêutico secundário mais adequado no tratamento da GVHD (Dignan e cols., 2012; Martin e cols., 2012). Os estudos disponíveis sobre a eficácia de agentes individuais utilizados como segunda linha de tratamento para a doença são poucos e contraditórios, impossibilitando a escolha de apenas um fármaco para uso em pacientes com GVHD refratária a esteróides (Dignan e cols., 2012).

Atualmente, fármacos como sirolimus e alemtuzumab, que interferem primariamente na função de células T, células apresentadoras de antígenos, células B, células NK e suas vias têm sido empregadas como segunda linha para o tratamento sistêmico da doença do enxerto-versus-hospedeiro aguda (como pode ser observado na tabela 1 que expõe os principais fármacos utilizados atualmente para profilaxia ou tratamento da GVHD e seus efeitos) (Wolf e cols., 2011; Blazar e cols., 2012; Martin e cols., 2012). Outros fármacos, como infliximab e etanercept, também são utilizados e inibem TNF- α ou seu receptor, modificando a resposta inflamatória (Tabela 1) (Wolf e cols., 2011; Blazar e cols., 2012; Martin e cols., 2012). Entretanto, a maior parte destas opções terapêuticas induz benefícios clínicos apenas a uma proporção limitada de pacientes (Westin e cols., 2011). Além disso, os agentes terapêuticos de segunda linha também não estão isentos de efeitos colaterais e podem causar citopenia,

nefrotoxicidade, edema, hepatotoxicidade, anafilaxia e não se sabe até o momento, se estas terapias podem atenuar o efeito do enxerto-versus-tumor (Martin e cols., 2012). Neste contexto, a investigação de novas estratégias terapêuticas tem sido o foco de muitos estudos, porém poucos deles exploram alternativas fitoterápicas para profilaxia ou tratamento da GVHD.

Existem evidências recentes que apontam que a resposta imune exacerbada e suas complicações podem ser atenuadas com o uso de fitoterapia e compostos encontrados na natureza (Kaminogawa e cols., 2004; Bellavite e cols., 2005) incluindo algas marinhas. Considerando a relevância destas descobertas, estudos científicos que explorem as propriedades desses compostos são fundamentais.

Categoria	Tratamento	Agentes	Efeitos
Pequenas moléculas	Inibidores de PKC	AEB071	Anergia célula T, aumento da função de T _{Reg}
	Inibidores de CCR5	Maraviroc	Interferência na migração de célula T
	Inibidores de mTOR	Rapamicina; Everolimus	Diminuição de células Th1, manutenção de T _{Reg}
	Agentes de hipometilação	Azacitidine	Inibição de APC, anergia célula T, indução de T _{Reg}
	Inibidores de HDAC	LBH589 Vorinostat	Inibição de APC, anergia célula T, indução de T _{Reg}
	Inibidores de tirosina quinase	Imatinib, nilotinib	Inibição de PDGFR
Anticorpos e fusão de proteínas	Depleção de célula T	Globulina anti-timócito	Supressão geral de célula T
	Inibidor TNF	Infliximab, Etanercept	Redução resposta inflamatória e ativação de APC
	Anticorpo anti-CD25	Denileukin, basiliximab, daclizumab	Deleção de células T ativadas
	Anticorpo anti-CD3	Visilizumab	Diminuição da ativação de células T
	Anticorpo anti-CD20	Rituximab	Inibição de célula B, inibição de APC
	Anticorpo anti- CD52	Alemtuzumab	Supressão de célula B e T
Agentes que afetam a microbiota	Agentes antibacterianos	Rifaximin	Descontaminação intestinal
	Bactéria probiótica	<i>Lactobacillus</i> spp.	Mudanças na microbiota intestinal
Terapias celulares	Infusão de T _{Reg}	Células T _{Reg} derivada ex-vivo ou in-vivo	Inibição da ativação de célula T
	Infusão de células tronco mesenquimais	Várias origens	Imunomodulação de células B, T, NK e APC
	Infusão de células NK	Diferentes populações de NK	Inibição da aloreatividade de célula T, indução de T _{Reg}
Citocinas	KGF recombinante	Palifermin	Estimulação de células epiteliais e reparo
	IL-2 recombinante	IL-2 baixa dose	Indução de T _{Reg} in vivo
Agentes quimioterápicos	Drogas alvo de célula T	Pentostatin	Depleção de células T e menor retenção de células B
	Drogas alvo de células B e T	Ciclofosfamida	Depleção de células proliferativas B e T

Tabela 1. Agentes terapêuticos que vêm sendo utilizados em estudos clínicos para prevenção ou tratamento da GVHD e seus principais efeitos (Modificada de Blazar e cols., 2012).

Algas Marinhas

As algas marinhas vêm sendo exploradas economicamente pelo homem desde a antiguidade, sendo utilizadas como fonte de alimento, adubo, fertilizantes e corretivos para solo e produtos químicos (beta-caroteno, alginato, ágar e carragenano) (Dias, 2000). Nas últimas décadas é crescente o esforço de pesquisa e extração de moléculas bioativas derivadas dessas algas devido ao potencial de aplicação das mesmas no desenvolvimento de novos fármacos a partir de suas propriedades antimicrobianas, antiproliferativas, antioxidantes, entre outras (Faukner, 2000; Blunt e cols., 2006).

Algas vermelhas (Rhodophyta)

As algas vermelhas formam um grupo com mais de quatro mil espécies predominantemente marinhas (Dias, 2000). Os pigmentos ficobilina e ficoertrina são dominantes na maioria dos grupos sendo que o último apresenta cor vermelha e é responsável pela coloração que dá nome ao filo. Os pigmentos alfa-caroteno e beta-caroteno e a zeaxantina e luteína, além das clorofilas a e d, também são encontrados nos indivíduos desse filo (Dias, 2000).

As principais substâncias bioativas produzidas por algas vermelhas e extraídas para estudos são compostos terpênicos e polifenólicos (Faukner, 2001; Barahona e cols., 2003; Blunt e cols., 2006). Relata-se a extração de alcalóides bioativos de *Lophocladia* sp. (Gross e cols., 2006), compostos alogenados com potente atividade antibiótica (Vairappan, 2003; Vairappan e cols., 2004), lambda-carragenanos de *Chondrus ocellatus* com atividades imunomodulatórias e antitumorais (Zhou e cols., 2005), entre outros trabalhos.

Dentre as algas vermelhas, podemos destacar as algas vermelhas calcárias que possuem cerca de 300 a 500 espécies (Dias, 2000). Essas Rhodophytas da família Hapalidaceae precipitam carbonato de cálcio e de magnésio em suas paredes celulares. Na França, os volumes de extração de algas calcárias se encontram ao redor de 600 mil toneladas/ano (Dias, 2000).

No Brasil foi confirmada, na década de 60, ampla ocorrência de depósitos de algas calcárias na plataforma continental do Norte e Nordeste (Dias, 2000), assim como no Sudeste, posteriormente.

Lithothamnion muelleri

Lithothamnion muelleri é uma alga marinha vermelha calcária pertencente ao filo Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Corallinales e família Hapalidiaceae. Esta alga tem em sua composição principalmente carbonato de cálcio e polissacarídeos sulfatados potencialmente bioativos (Faulkner, 2000; Blunt e cols., 2006; Soares e cols., 2012). Alguns estudos têm demonstrado efeitos biológicos para algas do gênero *Lithothamnion*, como inibição da formação de pólipos e inflamação do trato gastrointestinal (Aslam, 2010); capacidade de promover diferenciação em cólon de humanos e modular a função estromal (Dame e cols., 2011); proteção contra lesões proliferativas neoplásicas e pré-neoplásicas no fígado, inibindo a formação de tumores hepáticos (Aslam e cols., 2012); proteção contra lesão hepática induzida por CCl₄ através de atividade antioxidante (Hong e cols., 2011); inibição de NF-κB e, conseqüente, redução da expressão gênica de cicloxigenase-2 (Gormam e cols., 2012). Diante do exposto, nosso estudo investigou as propriedades anti-inflamatórias da alga *L. muelleri* na GVHD.

2) JUSTIFICATIVA

Estudos recentes demonstram que algas vermelhas, pertencentes à mesma classe ou gênero da alga *Lithothamnion muelleri* apresentam propriedades anti-inflamatórias, antitumoral e imunomodulatória, atenuando uma resposta inflamatória exacerbada em órgãos como o intestino e o fígado, alvos também de lesões ocasionadas pela intensa resposta inflamatória observada na doença do enxerto-versus-hospedeiro. Dessa forma, torna-se de grande interesse o estudo da alga *Lithothamnion muelleri* na patogênese da GVHD aguda em camundongos.

3) OBJETIVOS

Este estudo teve como **objetivo geral** avaliar o efeito da alga *Lithothamnion muelleri* no controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro em camundongos.

3.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do tratamento com a alga LM no desenvolvimento da GVHD aguda em camundongos.

Os parâmetros avaliados foram:

I. Sobrevida dos animais;

II. Evolução dos aspectos clínicos da doença.

2. Avaliar o efeito do tratamento com a alga LM na resposta inflamatória associada à GVHD aguda em órgãos alvo da doença. Os parâmetros avaliados foram:

I. Evolução dos aspectos histopatológicos no fígado e intestino de camundongos submetidos à doença do enxerto-versus-hospedeiro;

II. Níveis das citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD, através do ensaio de ELISA no intestino, fígado e cérebro dos animais;

III. Acúmulo de células inflamatórias nos órgãos alvo da GVHD por meio da medição da atividade de enzimas específicas de macrófagos (n-acetilglicosaminidase, NAG) e neutrófilos (mieloperoxidase, MPO);

IV. Rolamento e adesão de células inflamatórias no intestino de camundongos submetidos à GVHD com a fração polissacarídica (FP) de LM ;

3. Avaliar a translocação bacteriana no intestino, fígado e sangue.

4. Avaliar o efeito do tratamento com carbonato de cálcio (CaCO_3) no desenvolvimento da GVHD.

5. Avaliar a função renal de camundongos submetidos à GVHD através da dosagem de creatinina sérica nos diferentes períodos da doença (fase de latência, início dos sinais e início da mortalidade).

6. Avaliar o efeito do tratamento com a alga LM na resposta do enxerto-versus-tumor (GVT).

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) 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. 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 do protocolo 120/09.

4.2) Alga *Lithothamnion muelleri*

Extratos da alga marinha *Lithothamnion sp.*, no qual prevalece a espécie *L. muelleri*, são atualmente comercializados pela indústria Phosther Algamar LTDA (Brasil) como um suplemento dietético (Vitalidade 50 + ®). O produto é registrado e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil (número 25003.040502/97 6.2119.0001.001-1).

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

4.3.1 Modelo de irradiação parcial

Os camundongos receptores, B6D2F1, foram irradiados subletalmente com 4Gy de radiação gama, fonte de CO⁶⁰ utilizando irradiador Gammacell - 220, no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. Dois dias após a irradiação eles

receberam 3×10^7 esplenócitos dos doadores parentais, C57BL/6J-WT, intravenosamente (i.v) (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 (transplante singênico). 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 ressuscitado 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 das células que foram injetadas no receptor. Um total de 3×10^7 células foram injetadas intravenosamente (i.v) nos camundongos receptores B6D2F1. A injeção de células de camundongos parentais C57BL/6J em camundongos B6D2F1 leva ao desencadeamento de uma reação GVHD aguda (El-Hayek e cols., 2005; Vodanovic-Jankovic e cols., 2006; Castor e cols., 2010; Castor e cols., 2011; Castor e cols., 2012b).

4.3. 2 Modelo de irradiação total

Os camundongos receptores, B6D2F1, foram irradiados letalmente com 8Gy de radiação gama, fonte de CO^{60} utilizando irradiador Gammacell - 220, divididos em uma dose inicial de 4Gy e duas horas após a primeira dose, uma segunda dose de 4 Gy, no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. No mesmo dia da irradiação os camundongos receberam 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula femoral de doadores

parentais, C57BL/6J-WT, intravenosamente (i.v) (Figura 3). O grupo controle do transplante foi realizado utilizando-se camundongos B6D2F1 que receberam células de camundongos também B6D2F1, portanto não desenvolveram a GVHD (transplante singênico). Para a realização do transplante uma suspensão de células foi preparada a partir de um “pool” de células do baço adicionadas a um “pool” de células da medula óssea femoral. O baço dos camundongos doadores foi retirado e processado de maneira idêntica à realizada no protocolo de irradiação parcial acima descrito. Para retirada das células da medula femoral, ambos os fêmures de cada camundongo foram retirados e suas cabeças cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13 x 0,38 mm para lavagem da medula com 3 ml de meio RPMI incompleto gelado. Depois, o líquido obtido do lavado contendo as células foi colocado em um tubo Falcon e centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer, conforme a contagem realizada também para as células do baço, citada anteriormente. Um total de 3×10^7 esplenócitos + 1×10^7 células da medula femoral foram injetadas intravenosamente (i.v) nos camundongos receptores B6D2F1, desencadeando um modelo de GVHD aguda mais severa que aquela observada no modelo de irradiação parcial. Todos os grupos experimentais receberam o antibiótico (ATB) ciprofloxacino diluído em água filtrada (70mg/L de ATB em água ofertada na mamadeira dos camundongos. A água com o antibiótico foi trocada a cada 2 dias) por 15 dias após a irradiação para evitar doenças secundárias à imunossupressão gerada pela ablação total da medula.

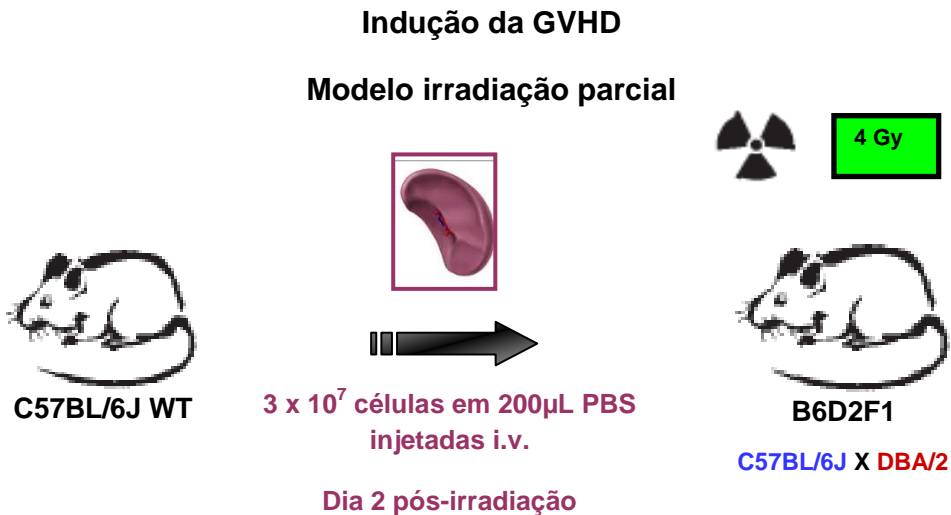


Figura 2. Indução da GVHD (modelo de irradiação parcial): Dois dias após a irradiação, os camundongos B6D2F1 sofreram transplante de células do baço oriundas dos doadores parentais, C57BL/6JWT. O transplante entre camundongos B6D2F1 para B6D2F1 não resulta em GVHD e foi definido como grupo controle.

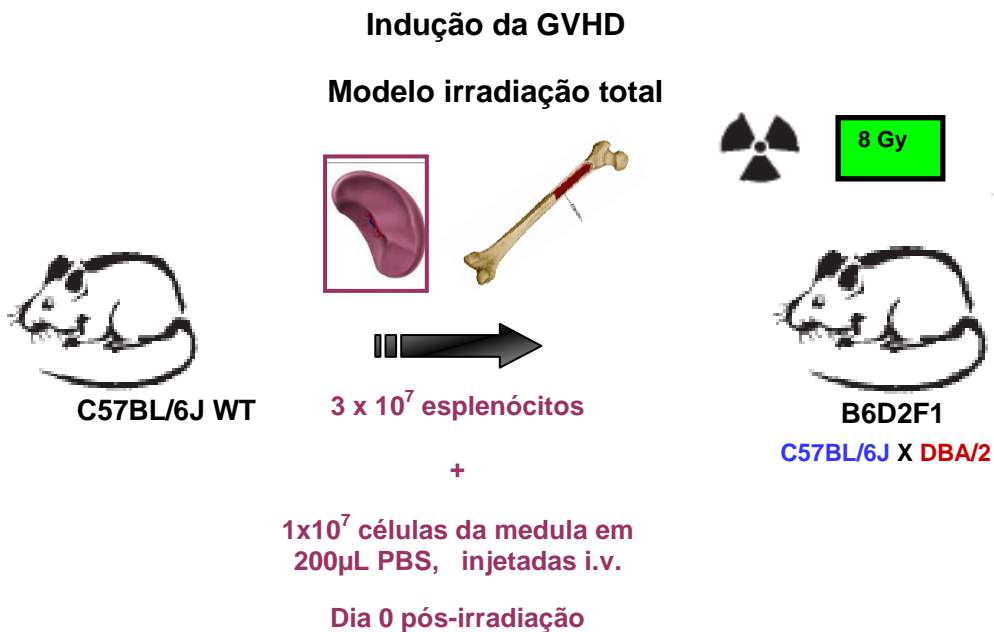


Figura 3. Indução da GVHD (modelo de irradiação total): No mesmo dia da irradiação, os camundongos B6D2F1 sofreram transplante de células do baço e células da medula óssea femoral oriundas dos doadores parentais, C57BL/6J. O transplante entre camundongos B6D2F1 para B6D2F1 não resulta em GVHD e foi definido como grupo controle.

4.4) **Tratamentos utilizados**

Os camundongos B6D2F1 que receberam esplenócitos de C57BL/6J (C57BL/6J para B6D2F1), ou seja, em que foi induzida à GVHD, foram divididos e nomeados em diferentes grupos de acordo com o tratamento administrado: grupo GVHD (animais doentes e não tratados), grupo LM (animais doentes e tratados com a alga *L. muelleri*), grupo CaCO₃ (animais doentes e tratados com carbonato de cálcio) e grupo FP (animais doentes e tratados com única dose de uma fração polissacarídica da alga LM). Os animais do grupo controle, que não sofreram a indução da GVHD, não receberam nenhum tipo de tratamento.

LM nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 1% foi oferecida na dieta do grupo denominado LM um dia antes do transplante e mantida até o final dos experimentos. Para preparo desta dieta, foram misturados 100 g de ração triturada com LM nas concentrações a serem testadas (0,1%, 0,3% ou 1% de LM) em 60 ml de água filtrada. Após a realização deste experimento de dose resposta, o grupo LM foi tratado com LM na concentração de 1% (melhor dose testada) em todos os experimentos subsequentes. O grupo GVHD recebeu apenas a ração triturada misturada em água filtrada (a cada 100 g de ração foram adicionados 60 ml de água filtrada). O grupo CaCO₃ recebeu dieta contendo 0,9% de carbonato de cálcio (porcentagem de cálcio encontrada na alga LM), preparada de maneira idêntica à dieta do grupo LM. A fração polissacarídica (FP) da alga foi analisada apenas no experimento de análise do recrutamento celular por microscopia intravital: os camundongos foram tratados por via endovenosa com uma única dose de 200 µl de veículo (PBS-5% etanol) ou FP (100 mg/kg em PBS-5% etanol), 30 minutos antes do experimento.

4.5) Avaliação dos parâmetros clínicos

Após o transplante de esplenócitos, houve acompanhamento dos parâmetros clínicos da GVHD, a cada dois dias, através de uma escala clínica, com pontuação de 0 a 14 (tabela 1). Esta escala foi criada a partir de uma adaptação de dados obtidos na literatura (Cooke e cols., 2001; Colson e cols., 2004; Castor e cols., 2010; Castor e cols., 2011; Castor e cols. 2012b) 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 kit diagnóstico da FECA-CULTTM, 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 (pêlo arrepiado) foi pontuado com dois pontos quando apresentou alterações ou com zero quando não ocorreu alteração. 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, 0,5 quando foi observada uma apatia leve, 1,0 para apatia moderada e 2,0 quando a apatia ficou grave (letargia). As fezes dos animais também foram avaliadas e pontuadas, quanto à presença de diarreia em zero (fezes sem alterações), 1,0 (fezes pastosas) e 2,0 (fezes líquidas) e quanto à presença ou não de sangue: 0 (ausência), 1,0 (moderada quantidade de

sangue) e 2,0 (grande quantidade de sangue). 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/ 0,5: apatia leve/ 1,0: apatia moderada/ 2,0: letargia.
Textura do pêlo (pêlo arrepiado)	0: ausência / 2,0: presença
Integridade da pele	0: ausência de lesão / 2,0: presença de lesão
Sangue oculto nas fezes	0: ausência / 1,0: moderada quantidade de sangue/ 2,0: grande quantidade de sangue
Diarréia	0: ausência / 1,0: pastosa / 2,0: líquida
Total	14 pontos

Tabela 2 – Escala clínica. Adaptada a partir de dados da literatura (Cooke e cols., 2001; Colson e cols., 2004; Castor e cols., 2010; Castor e cols., 2011; Castor e cols., 2012b) para a verificação dos parâmetros clínicos ocasionados pela reação inflamatória ocasionada pela GVHD.

4.6) **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 III – 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.

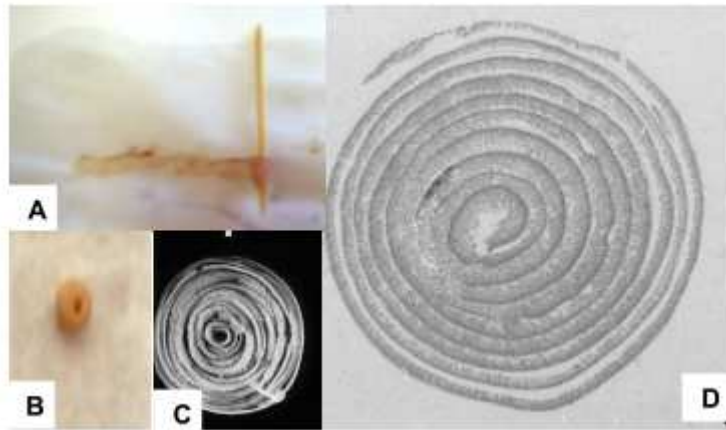


Figura 4. Preparação dos intestinos para confecção de lâminas histológicas em forma de rocambole. (A) Os intestinos foram gentilmente enrolados com a ajuda de um palito de madeira começando o rolo pela sua porção inicial. (B) intestino em forma de rolo após imersão em formol. (C) Visão superior do intestino em forma de rolo em aumento maior (foto: Arantes & Nogueira,1997). D – Corte em micrótomo do intestino (foto: Arantes & Nogueira, 1997).

4.7) **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 (Thiele e cols., 1989; Hill e cols. 1997; Colson e cols. 2004). 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.

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 5).

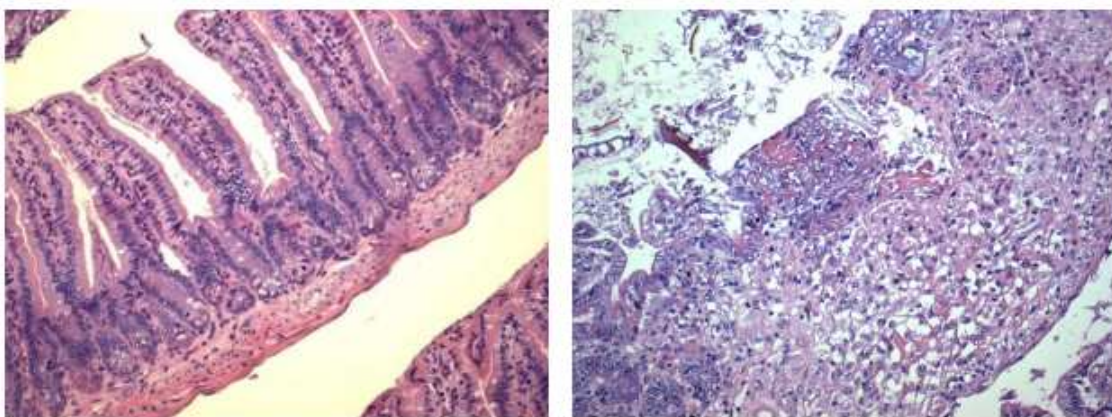


Figura 5. Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do intestino.

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 à camada submucosa devido à destruição das vilosidades, edema e congestão. As camadas muscular e serosa apresentam sinais de necrose e intensas alterações inflamatórias.

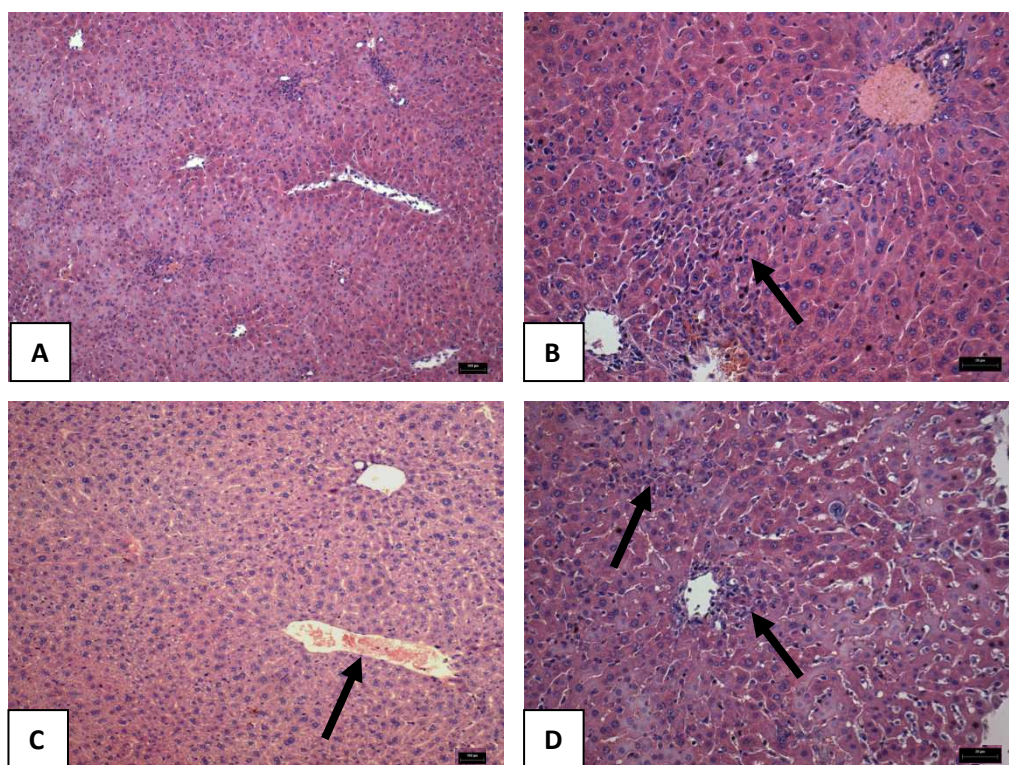


Figura 6. Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado. Em A, observamos a lâmina de um fígado avaliado com graduação mínima. Em B e D, observamos lâminas com a presença de congestão vascular e infiltrado acentuado nos vasos da área periportal e veia centro lobular que invade o parênquima hepático. Em C, podemos observar a lâmina de um fígado com sinais de necrose hepatocitária, alteração da forma do hepatócito e alargamento dos sinusóides.

4.8) **Quantificação de muco intestinal (coloração por Ácido Periódico de Schiff)**

Para avaliação da presença de muco intestinal, os intestinos dos animais foram retirados e preparados em forma de rocambole conforme descrito no item 4.7 deste trabalho. 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 Ácido periódico 0,5% (5 minutos), lavadas em água destilada em 1 mergulho por 5 minutos e novamente coradas com Reativo de Schiff (10 minutos ou mais, até os cortes ficarem rosa pálido). Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá sintético. Após a coloração, para a análise do muco, foram capturadas imagens de três campos da porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera. As imagens foram analisadas com a utilização do software Image J. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em µm² PAS/campo.

4.9) **Quantificação de citocinas e quimiocinas**

O intestino delgado, fígado e cérebro dos animais foram retirados 3, 10 e 20 dias após o transplante. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos destes órgãos através de *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Cem miligramas da porção jejuno-íleo do intestino delgado (úmido), do lobo quadrado hepático ou 50 miligramas de cada lado dos hemisférios cerebrais 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 ELISA com diluição de 1:4. O ensaio ELISA foi realizado conforme as instruções do fabricante (R&D System) e quantificado a partir do comprimento de onda de 492nm adquirido em leitor de placas.

4.10) **Quantificação do infiltrado 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 μ L do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na₂ HPO₄ 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 μ L 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.

4.11) **Quantificação do infiltrado de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos em órgãos alvos da GVHD, foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. Uma porção de 100mg de intestino ou fígado foi ressuspensa em solução de Buffer I (1,9 ml/100 mg) contendo NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M e Na₂EDTA 0,015M (pH 4,7 - 4° C). Logo em seguida, foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 4° por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspensa em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensa em tampão fosfato com HETAB a 0,5% e Na₃PO₄. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. Atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras (diluição 1:3) foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetrametilbenzina (1.6 mM) por 5 minutos, H₂O₂ (0.5 mM por 5 minutos) e H₂SO₄. Os resultados foram expressos em número relativo de neutrófilos por miligrama (mg) de tecido úmido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de neutrófilos”/100mg de tecido.

4.12) **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 térmica mantida 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 intestinais 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 100 μm de vaso.

4.13) **Translocação bacteriana**

Para a verificação da translocação bacteriana, após o sacrifício dos animais, injetou-se 2 ml de PBS autoclavado na cavidade peritoneal e 100 μL do líquido recolhido foram espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura Muller Hilton. Cem microlitros de sangue e 100mg de fígado triturado em 1ml de PBS autoclavado também foram coletados e 100 μL da amostra foram espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura ágar Miller Hilton . O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 horas de armazenamento da placa em estufa a 37° através da contagem do número de CFU (unidade formadora de colônia).

4.14) **Dosagem de creatinina sérica**

Amostras de sangue foram coletadas 3, 10 e 20 dias após o transplante através da veia cava abdominal dos animais sob anestesia com quetamina e xilazina (150 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente). Estas amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 15 min a 4°C. O plasma resultante foi congelado a -20°C e utilizado posteriormente para mensuração das concentrações de creatinina através de kit enzimático apropriado (Bioclin/Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.15) **Avaliação da resposta do enxerto contra o tumor (graft versus tumor ou GVT)**

Uma linhagem celular de mastocitoma murino, P815 (H-2d, American Type Culture Collection, Rockville, MD), transduzida com um vetor (EF1 α GFP) foi gentilmente cedida por A. C. Leal e M. Bonamino (Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil) e mantidas em RPMI/10% FCS a 37°C, em 5% CO₂. GVHD foi induzida utilizando o mesmo protocolo descrito no item 4.4. Após a indução da doença, no dia 0 pós-transplante, dez mil células P815 GFP + foram injetadas intravenosamente nos camundongos B6D2F1. Os camundongos submetidos à doença do enxerto-versus-hospedeiro e ao transplante de células tumorais, foram monitorados a cada dois dias para a sobrevivência.

4.16) **Análise Estatística**

Os resultados no texto são apresentados como média \pm erro padrão da média (\pm SEM). A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela one-way ANOVA e complementada pelo teste Student-Newman-Keuls. O teste estatístico log rank test foi utilizado para comparar as curvas de sobrevivência. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

5) RESULTADOS

5.1) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz sinais clínicos e mortalidade em camundongos submetidos à GVHD

Camundongos que receberam os esplenócitos doados (C57BL/6 para B6D2F1) desenvolveram GVHD aguda, o que foi confirmado por 100% de letalidade no vigésimo segundo dia após a indução da doença e por uma graduação clínica igual ou maior a 7 como pode ser observado na Figura 7. Em contraste, o grupo controle (transplante de B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveu a doença e apresentou 100% de sobrevivência até o final do experimento.

Para verificar as possíveis propriedades terapêuticas da *L. muelleri* na GVHD, primeiramente, um experimento de dose resposta foi realizado. Os animais tratados com LM a 1% apresentaram uma melhora clínica associada à menor perda de peso e menor graduação clínica da doença, comparada às outras doses testadas (Figura 7). Dessa forma, a dose de 1% foi definida como a melhor dose da LM para proteção da GVHD aguda e utilizada em todos os experimentos subsequentes. Para confirmar os dados anteriores, o tratamento com LM 1% foi repetido e, novamente resultou em 60% de sobrevivência (Figura 8A) e significativa redução da graduação clínica e perda de peso (Figura 8B-C) quando comparado aos animais submetidos à GVHD. É interessante notar que mesmo após cessar o tratamento com LM, no 22º dia após o transplante, quando ocorreu a morte de todos os camundongos doentes e não tratados, os camundongos do grupo tratados com a alga *Lithothamnion muelleri* mantiveram-se vivos (60% de sobrevivência) até o 40º dia pós-transplante, quando foram sacrificados (Figura 8A).

Para confirmar os efeitos do tratamento com *L. muelleri* na GVHD nós testamos esta alga num modelo mais grave da doença, induzida a partir da irradiação total e consequente ablação completa da medula óssea dos camundongos receptores. O tratamento com LM neste modelo de GVHD também apresentou efetiva proteção demonstrada pela mesma percentagem de sobrevivência dos animais tratados no modelo de irradiação parcial, além de menor graduação clínica e menor perda de peso (Figura 9A, B e C, respectivamente) comparado ao grupo não tratado.

É importante destacar que animais que não foram submetidos à indução da GVHD e tratados com LM (Grupo Controle LM) mostraram a mesma percentagem de sobrevivência (Figura 8A), graduação clínica (Figura 8B) e ganho de peso (Figura 8C) dos animais do grupo controle, não expostos à doença e que não receberam nenhum tratamento. Estes dados indicam que o tratamento com a alga *L. muelleri* sozinho não modifica os parâmetros analisados.

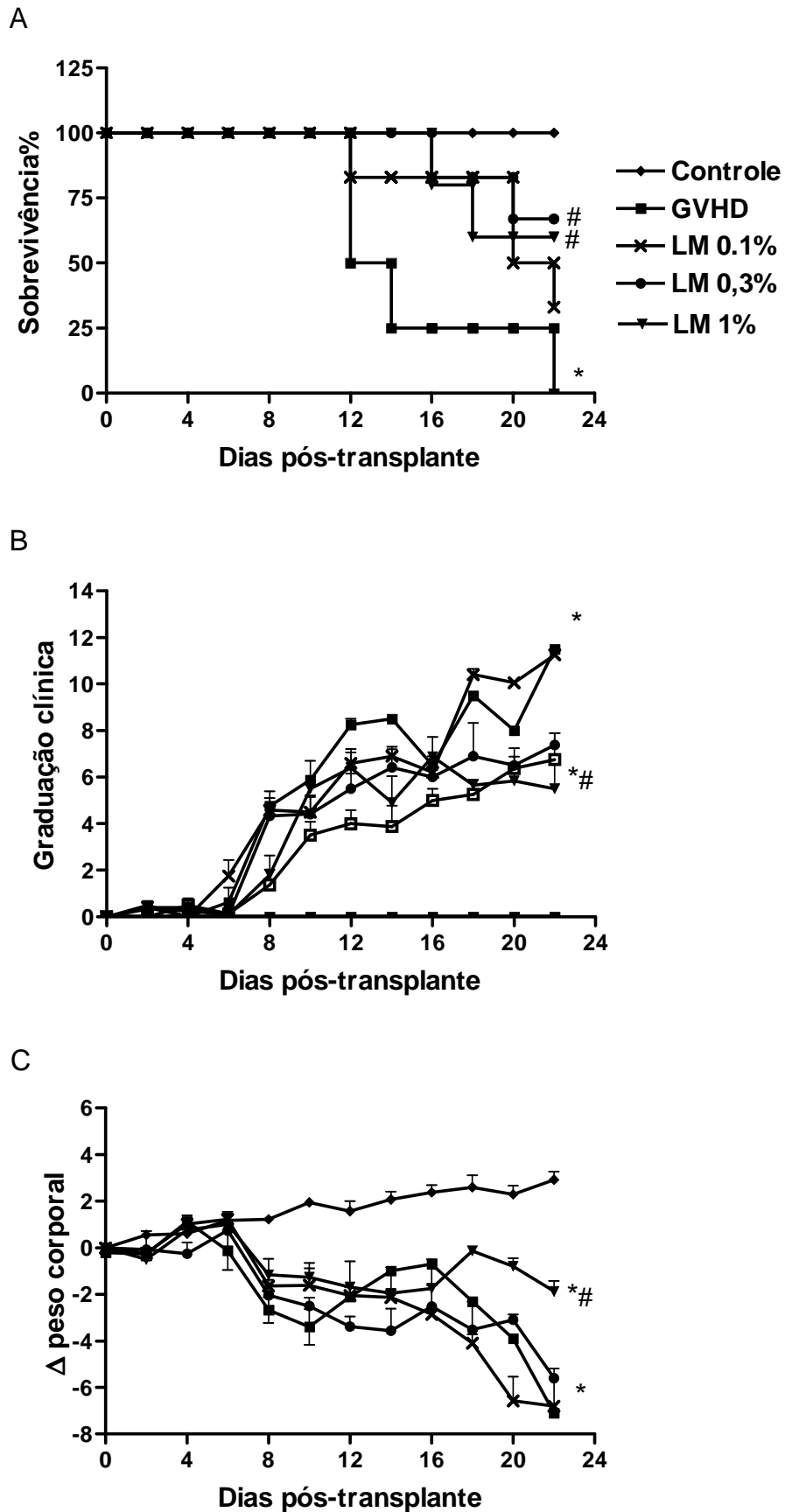


Figura 7. Tratamento com LM protege camundongos submetidos à GVHD de maneira dose dependente. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos

doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência (A), ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (B) e controle do peso corporal (C). Os resultados são apresentados como média \pm SEM e os grupos representados como se segue: Grupo Controle (\blacklozenge , n=6); Grupo GVHD (\blacksquare , n=7), Grupo LM 0,1% (\times , n=7), Grupo LM 0,3% (\bullet , n=7), Grupo LM 1% (\blacktriangledown , n=7). * e #P < 0.05 quando comparados ao Grupo Controle e Grupo GVHD, respectivamente.

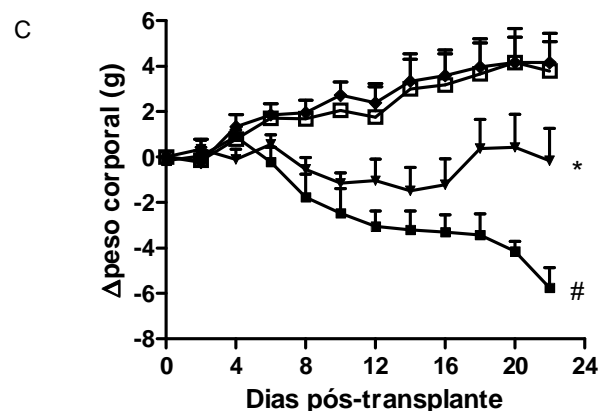
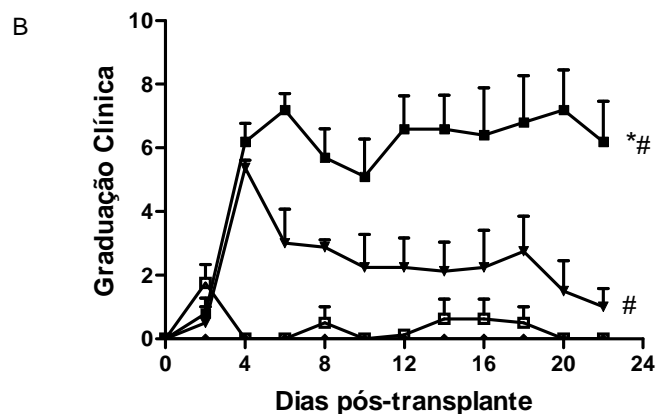
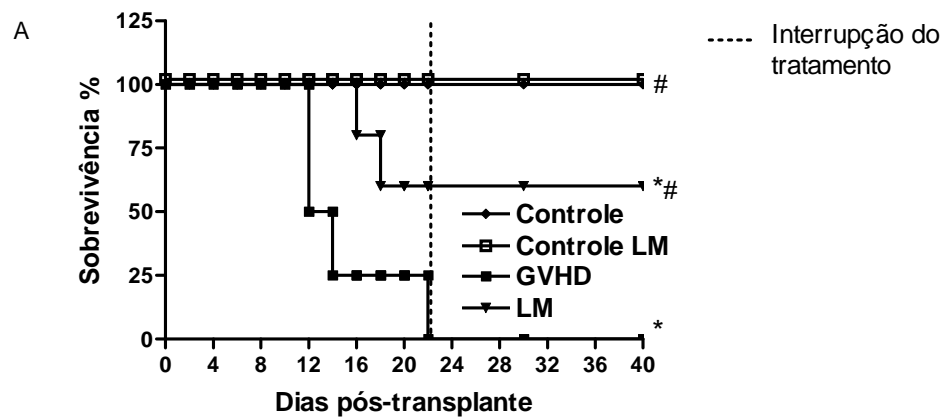


Figura 8. Tratamento com LM protege da GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle (não tratado) e grupo Controle LM (tratados, não submetidos à GVHD). LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência (A), ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (B) e controle do peso corporal (C). Os resultados são apresentados como média \pm sem e os grupos representados como se segue: Grupo Controle (\blacklozenge , n=6); Grupo Controle LM (\square , n=6); Grupo GVHD (\blacksquare , n=7), Grupo LM 1% (\blacktriangledown , n=7). * e #P < 0.05 quando comparados ao Grupo Controle e Grupo GVHD, respectivamente.

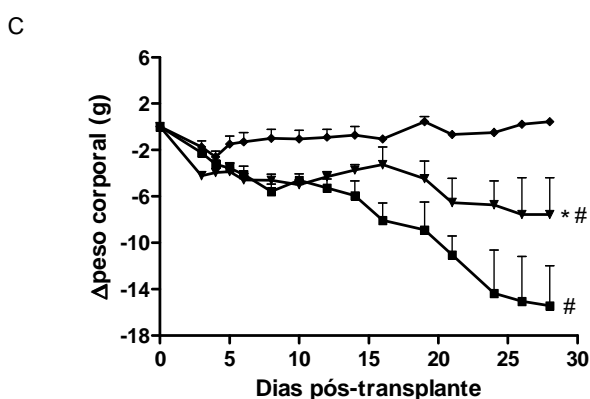
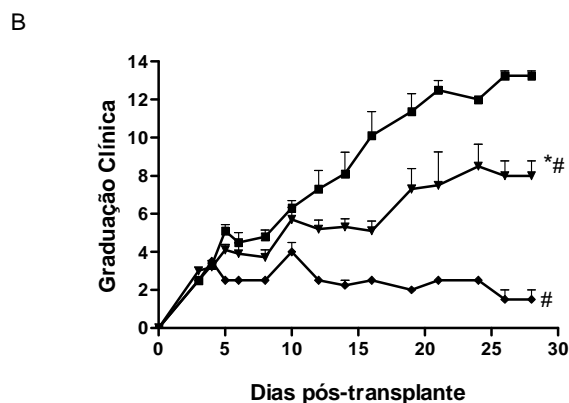
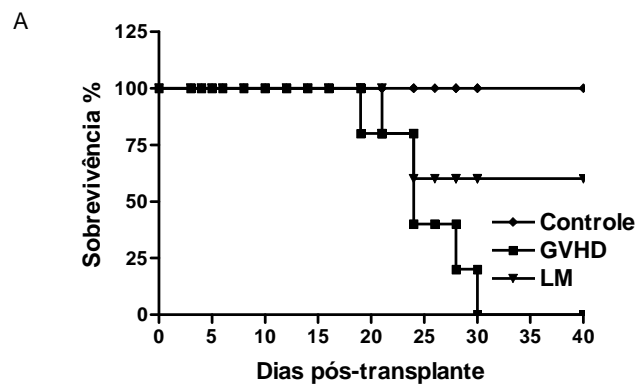


Figura 9. Tratamento com LM protege os camundongos em um modelo mais grave de GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos adicionados de 1×10^7 células da medula óssea de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados com dose letal para depleção da medula óssea. Camundongos que receberam esplenócitos + células medulares de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência (A), ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (B) e controle do peso corporal (C). Os resultados são apresentados como média \pm sem e os grupos representados como se segue: Grupo Controle (\blacklozenge , n=6); Grupo GVHD (\blacksquare , n=7), Grupo LM (\blacktriangledown , n=7). * e #P < 0.05 quando comparados ao Grupo Controle e Grupo GVHD, respectivamente.

Considerando os resultados acima, hipotetizamos que a melhora observada nos animais submetidos à GVHD e tratados com a alga *L. muelleri* poderia estar relacionada à proteção de órgãos alvo da doença, como o intestino e o fígado, o que nos conduziu aos nossos próximos experimentos.

5.2) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz lesão intestinal e hepática em camundongos submetidos à GVHD

Secções do intestino e fígado foram avaliadas 3, 10 e 20 dias após o transplante (correspondentes à fase de latência, início dos sinais e início da mortalidade, respectivamente). No intestino, mudanças morfológicas significativas foram detectadas no dia 3 e aumentaram progressivamente com o desenvolvimento da doença no grupo GVHD. No 3º dia, foram observados no grupo GVHD, edema moderado e congestão da lâmina própria. Houve também aumento no número de células inflamatórias, associado a áreas focais de

alargamento das vilosidades. Na camada correspondente à muscular e serosa, foi encontrado um infiltrado inflamatório local moderado no grupo GVHD. Neste mesmo período, no grupo tratado com LM, foi observado apenas leve edema e discreto infiltrado inflamatório no intestino (Figura 10A).

No 10º dia após a indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro, foram observadas mudanças nos núcleos das células epiteliais e hiperplasia de criptas e da superfície epitelial. Áreas de ulceração e um importante aumento de células inflamatórias foram encontrados na lâmina própria. Ocorreu ainda o alargamento das vilosidades com edema e congestão. Na camada muscular e serosa, houve a presença de intenso infiltrado inflamatório. Neste estágio da GVHD, o tratamento com *L. muelleri* não modificou os parâmetros analisados em comparação com o grupo GVHD, resultando em uma similar graduação histopatológica para ambos (Figura 10B).

No 20º dia após o transplante, ocorreu perda parcial da arquitetura do órgão, celularidade aumentada, edema e congestão no intestino de animais submetidos à GVHD e não tratados. Foram observadas ainda mudanças degenerativas graves e ulceração da mucosa, com áreas focais de necrose na camada muscular e serosa (Figura 11A e D). O tratamento com LM causou uma significativa melhora na graduação histopatológica e na preservação da arquitetura do órgão, com raras erosões superficiais na mucosa. Observou-se ainda menor infiltrado inflamatório e edema na lâmina própria, com preservação da camada muscular e serosa (Figura 11A e E).

Visto que o intestino de animais tratados com *L. muelleri* é protegido do dano tecidual causado pela GVHD, realizamos posteriormente a quantificação de muco nas vilosidades intestinais, importante barreira protetora deste órgão. Como observado na figura 11B e 11G, o

grupo GVHD apresentou uma diminuição do número de células caliciformes marcadas com ácido Periódico de Schiff, corante para mucinas, principais componentes do muco. A quantidade de muco presente no intestino dos camundongos do grupo LM foi similar à do grupo controle (Fig. 11B, F e H), o que pode ter contribuído para a proteção intestinal observada nos camundongos tratados com *Lithothamnion muelleri*.

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, foram observadas pequenas alterações no fígado no 3º dia após o transplante em camundongos com GVHD e por isso, neste trabalho, não realizamos a análise do órgão nessa fase da doença. No dia 10, houve discreto edema e aumento da celularidade entre os hepatócitos e nas áreas periportais. O tratamento com LM não modificou esses parâmetros (dados não mostrados). Entretanto, no 20º dia após o transplante, ocorreu acentuada lesão hepática distribuída ao longo de todo o parênquima do órgão no grupo GVHD (Figura 12A e C). O dano no parênquima foi associado com intenso infiltrado inflamatório, principalmente nas áreas periportais, vasodilatação, necrose de hepatócitos e vacuolização difusa (Figura 12A e C). Em contraste, animais do grupo LM mostraram significativa preservação do tecido hepático com leve edema tecidual e diminuição do acúmulo de células inflamatórias (Figura 12A e D).

Uma vez que as diferenças entre camundongos tratados e não tratados foram destacadas 20 dias após o transplante, nós nos concentramos principalmente neste tempo para as análises posteriores dos efeitos da alga *Lithothamnion muelleri* na GVHD.

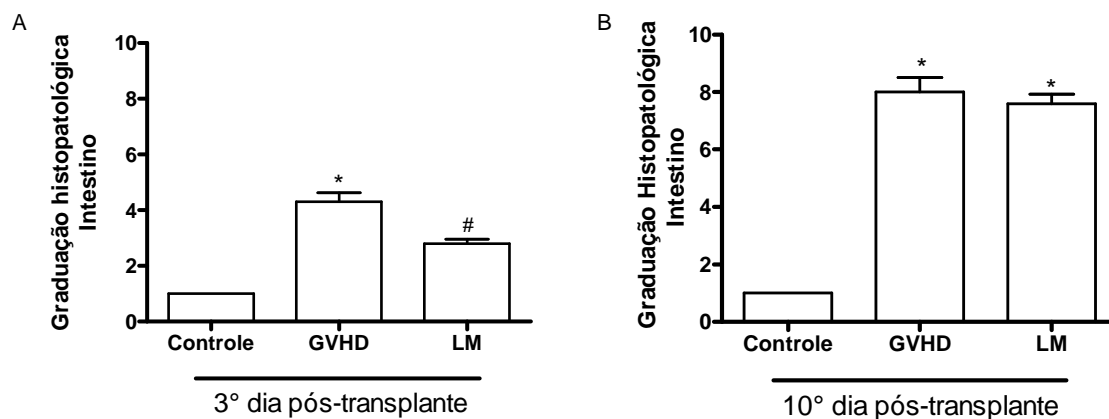


Figura 10. Efeito do tratamento com LM na gradação histopatológica intestinal no 3° e 10° dia após o transplante. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram sacrificados e amostras do intestino foram coletadas para análise histopatológica 3 (A) e 10 dias (B) após o transplante. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 3). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

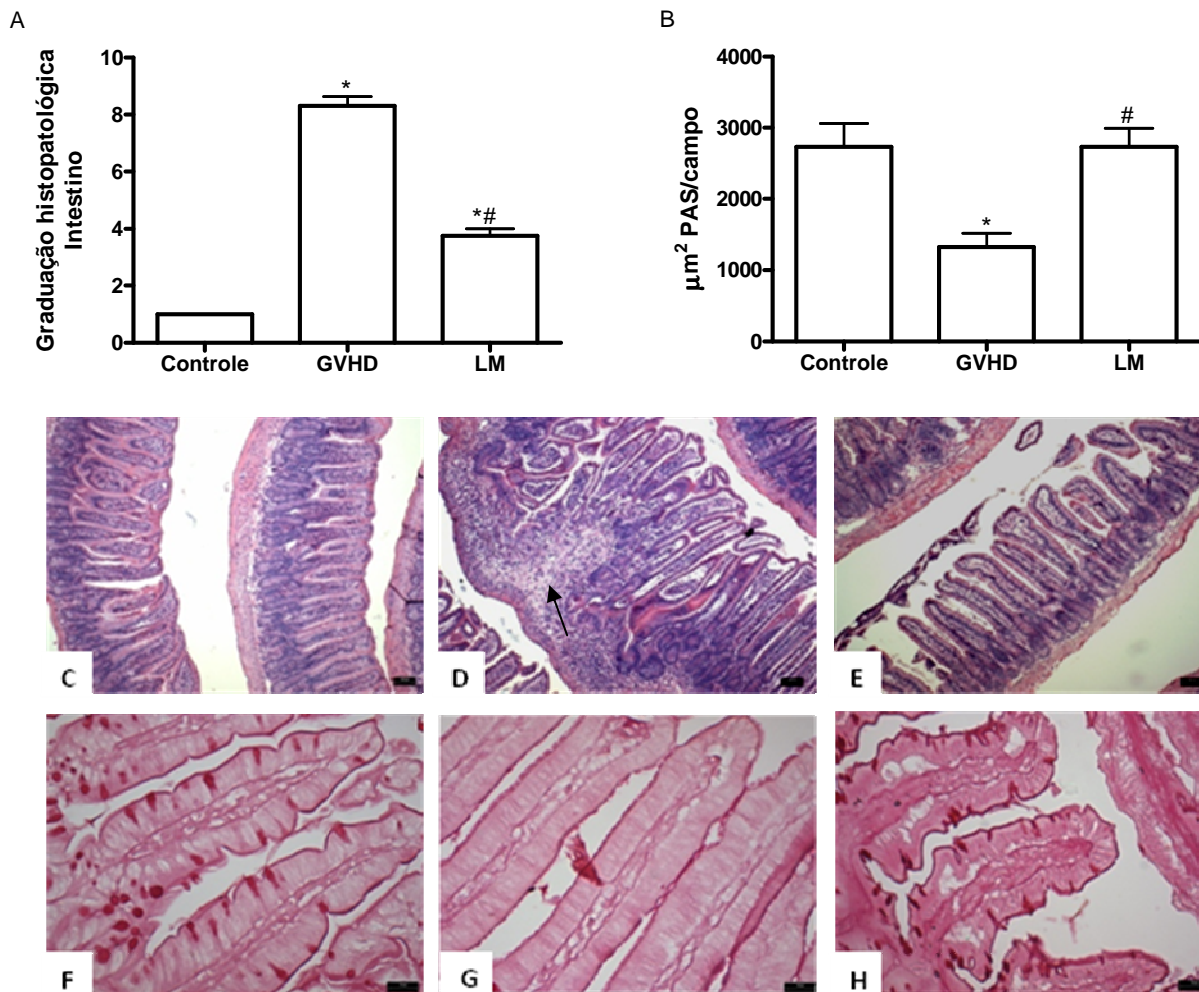


Figura 11. Tratamento com LM reduz lesão intestinal em camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semiallogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram sacrificados e amostras do intestino foram coletadas para análise histopatológica 20 dias após o transplante (A). A média do número de células caliciformes positivamente coradas para PAS foi determinada num aumento de 40x/campo, sendo contados 3 campos por secção intestinal (B). C-E, Aspectos histopatológicos de seções do intestino coradas com H&E nos grupos Controle, GVHD e LM, respectivamente, 20 dias após o transplante. Escala de barra, 50 μm para todos os painéis. F-H, seções intestinais com células caliciformes positivamente coradas para PAS

nos grupos Controle, GVHD e LM, respectivamente, 20 dias após o transplante. Escala de barra, 20 todos os painéis.

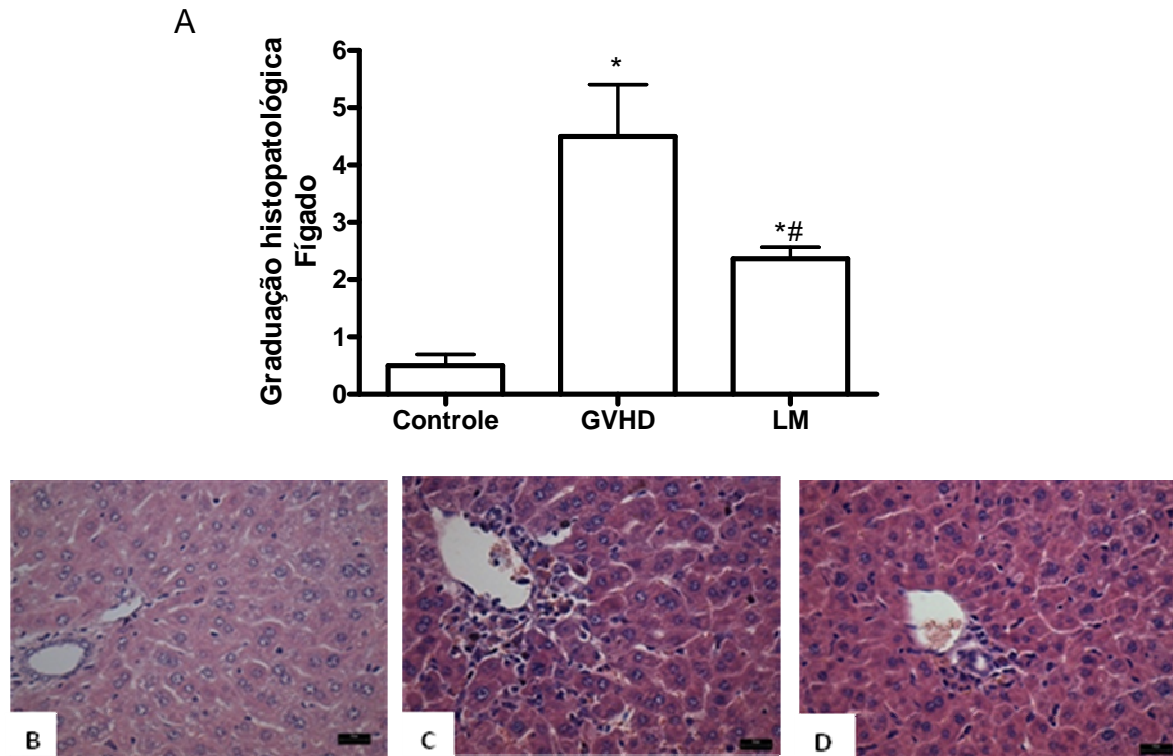


Figura 12. Tratamento com LM reduz lesão hepática em camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram sacrificados e amostras do fígado foram coletadas para análise histopatológica 20 dias após o transplante (A). B-D, Aspectos histopatológicos de seções do fígado coradas com H&E nos grupos Controle, GVHD e LM, respectivamente, 20 dias após o transplante. Escala de barra, 50 μ m para os painéis. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 6). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.3) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no intestino e fígado de camundongos submetidos à GVHD

Foi realizada também nos órgãos alvo da doença, a análise de quimiocinas e citocinas importantes na patogênese da GVHD. Os níveis das quimiocinas CCL2 (Figura 13A) e CCL5 (Figura 13B), e os níveis das citocinas TNF- α (Figura 13C) e IFN- γ (Figura 13D) no intestino de camundongos submetidos à GVHD apresentaram-se aumentados a partir do 10º dia após o transplante. Em camundongos submetidos à GVHD e tratados com *Lithothamnion muelleri*, os níveis de CCL2 (Figura 13A) e CCL5 (Figura 13B) estavam significativamente reduzidos no 20º dia após o transplante, enquanto que os níveis de TNF- α (Figura 13C) e IFN- γ (Figura 13D) não apresentaram aumento no 10º ou 20º dia após a indução da doença, permanecendo semelhantes aos níveis observados no grupo Controle.

No fígado de animais submetidos à GVHD, foi observado um aumento nos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 e nos níveis das citocinas TNF- α e IFN- γ a partir do 10º dia após o transplante, não havendo diferença nos níveis dos animais tratados com LM ou não tratados (dados não mostrados). Após 20 dias do transplante, os níveis destas quimiocinas e citocinas permaneceram elevados em animais submetidos à doença e não tratados. Nesta fase da doença, o tratamento com LM inibiu completamente os níveis de TNF- α hepático (Figura 14A) e reduziu parcialmente os níveis de CCL3 (Figura 14B) e CCL5 (Figura 14C). Já os níveis hepáticos de CCL2 e IFN- γ mantiveram-se elevados em ambos os grupos GVHD e LM quando comparados ao grupo Controle (dados não mostrados).

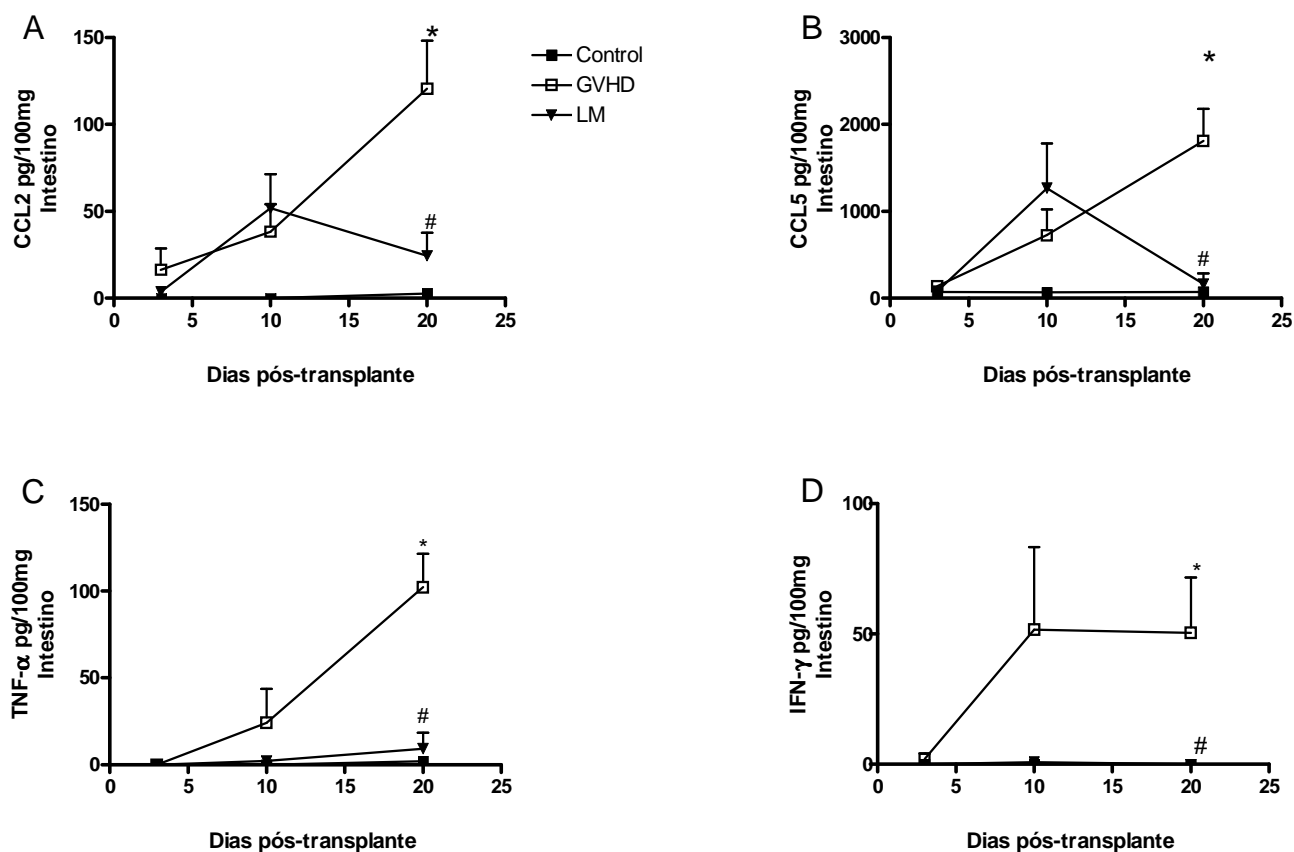


Figura 13. Tratamento com LM reduz a concentração intestinal de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. No dia 3, 10 e 20 após o transplante, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de CCL2 (A), CCL5 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D) foram avaliadas em homogenatos do jejuno-íleo pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

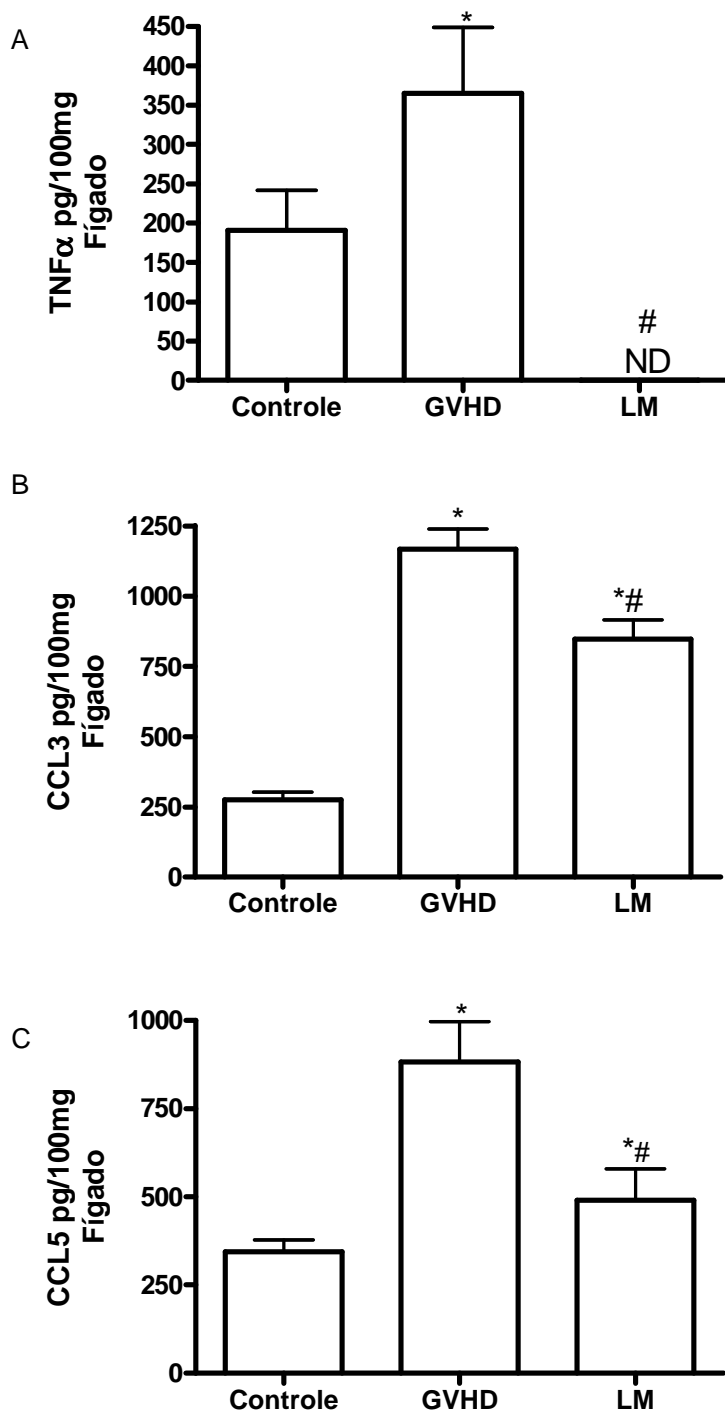


Figura 14. Tratamento com LM reduz a concentração hepática de citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e

mantida até o final do experimento. No dia 20 após o transplante, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de TNF- α (A), CCL3 (B) e CCL5 (C) foram avaliadas em homogenatos do fígado pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0,05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.4) **Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz o acúmulo de macrófagos no intestino e fígado de camundongos submetidos à GVHD**

Uma vez que a menor lesão nos órgãos alvo em camundongos tratados com LM foi associada à diminuição do infiltrado inflamatório observado na histologia e à diminuição nos níveis de citocinas e quimiocinas, nosso próximo passo foi avaliar o acúmulo de macrófagos, importante célula na patogênese da doença, no intestino e fígado de animais submetidos a GVHD. Foi observado um aumento da atividade da n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), um marcador indireto para influxo de macrófagos, no intestino (Figura 15A) e fígado (Figura 15B) no grupo GVHD quando comparado ao grupo Controle e LM. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) também foi analisada para verificar de maneira indireta o acúmulo de neutrófilos no intestino e fígado dos animais submetidos à GVHD, porém não foram observadas diferenças na atividade desta enzima entre o grupo Controle, GVHD e LM (dados não mostrados).

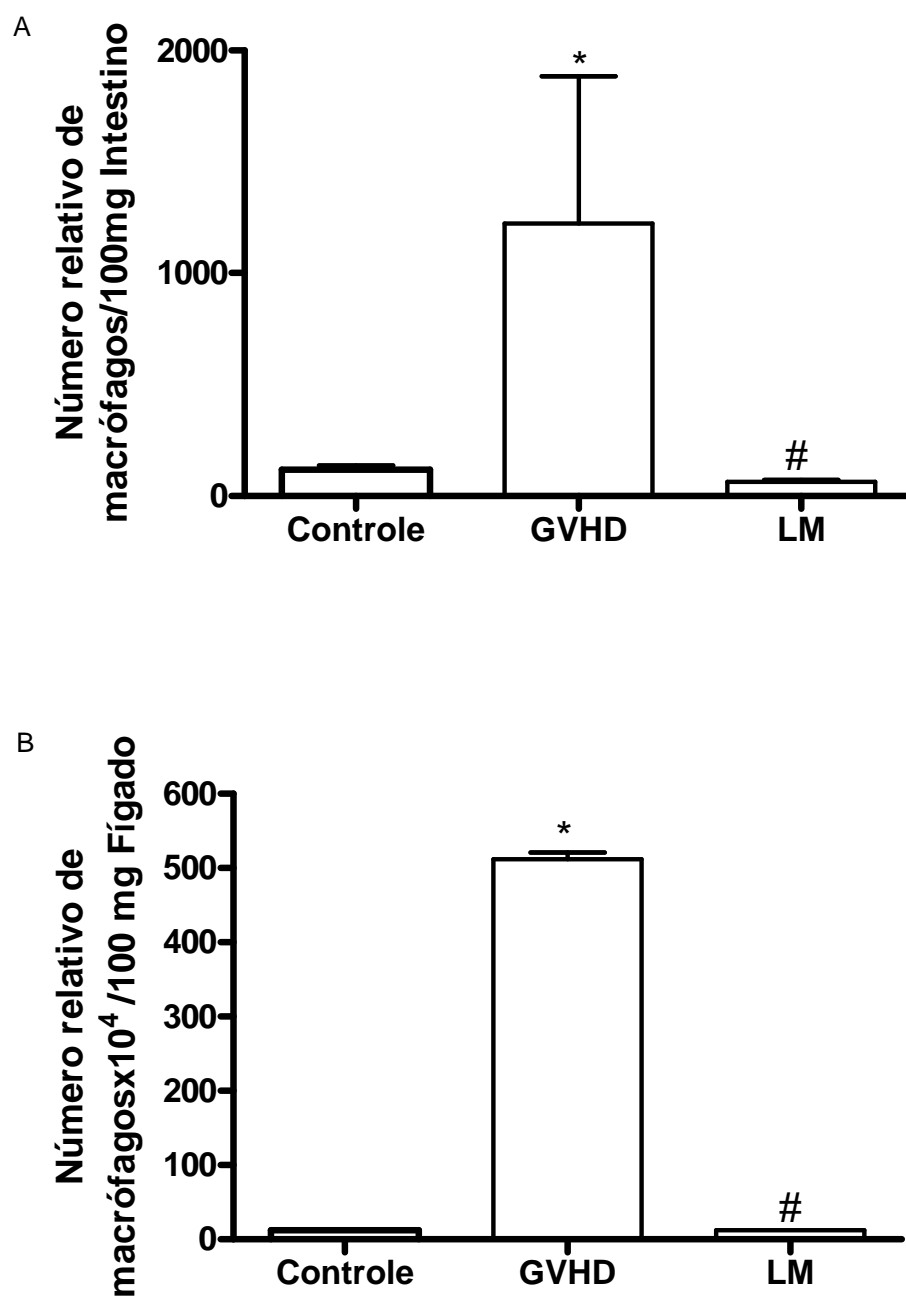


Figura 15. Tratamento com LM inibe o acúmulo de macrófagos em órgãos alvo da GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semiallogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do

experimento. No dia 20 após o transplante, os camundongos foram sacrificados e o acúmulo de macrófagos foi analisado no intestino (A) e fígado (B) através da atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Os resultados são apresentados como média ± SEM (n = 6). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.5) **Tratamento com *Lithothamnion muelleri* inibe a interação de células endoteliais e leucócitos na microvasculatura intestinal de camundongos submetidos à GVHD**

A alga *Lithothamnion muelleri* tem em sua composição polissacarídeos sulfatados, como demonstrado pela avaliação da composição química de extratos obtidos de LM realizada recentemente por Soares e cols., (2012).

Polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas possuem diversas atividades biológicas como anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antiviral e anti-inflamatória (Matsui e cols., 2003, Jiao e cols., 2011). Uma vez que observamos a maior sobrevida e diminuição dos sinais clínicos da GVHD em animais tratados com LM, associada à menor lesão intestinal, redução de citocinas e quimiocinas e diminuição do infiltrado inflamatório e influxo de macrófagos nos órgãos alvo da doença, nós hipotetizamos que os polissacarídeos de LM poderiam interferir diretamente no estágio inicial de migração de leucócitos, isto é, no rolamento e adesão de células inflamatórias para estes órgãos. Dessa forma, foi realizada a microscopia intravital de vênulas pós-capilares intestinais de animais submetidos à GVHD no 10º dia após a doença e tratados com uma fração polissacarídica (FP) de LM 30 minutos antes da análise. Como observado na figura 16, o tratamento com FP reduziu o rolamento (Figura 16A) e a adesão de leucócitos (Figura 16B) em vênulas mesentéricas.

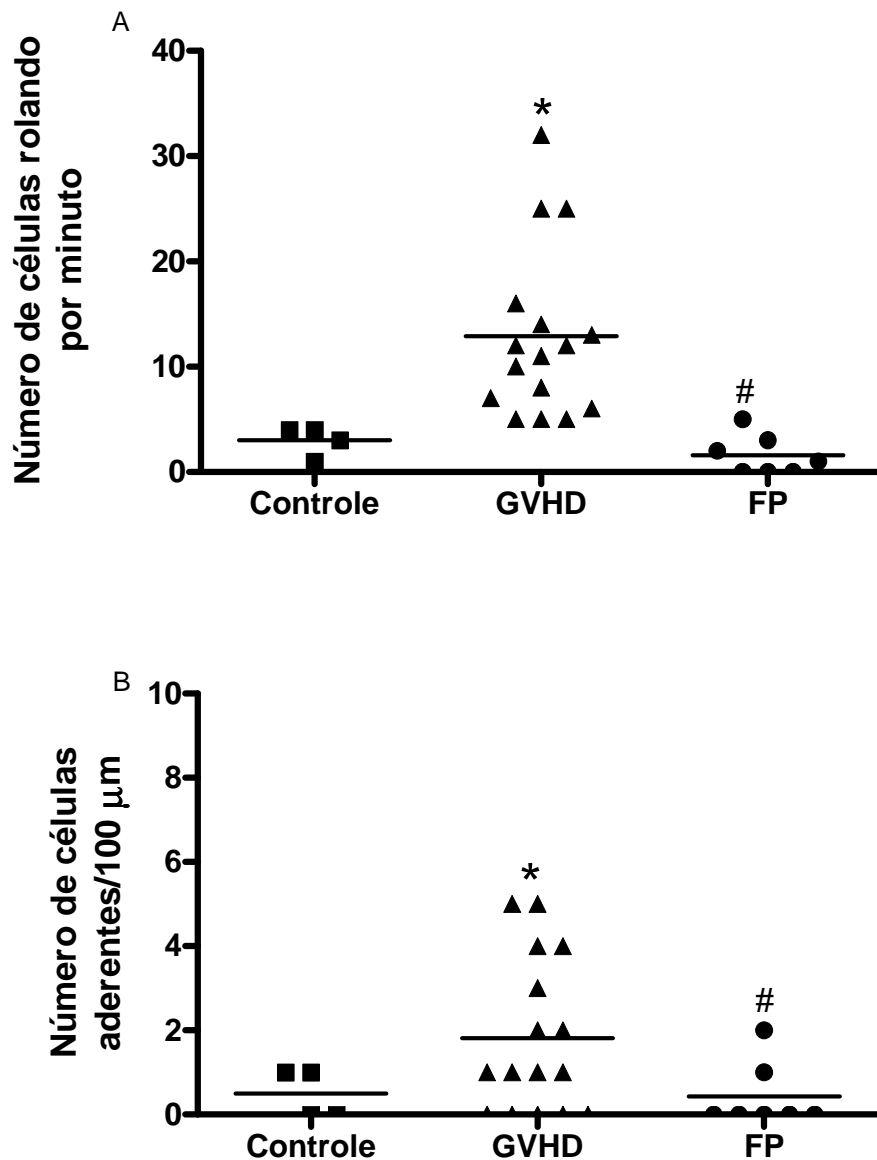


Figura 16. Tratamento com uma fração polissacarídica de LM diminui o rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura mesentérica de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semiallogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. No 10º dia após o transplante, os camundongos foram anestesiados e vênulas intestinais ($\pm 40 \mu\text{m}$) foram selecionadas para contagem do número de leucócitos rolando e aderidos através da microscopia intravital. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos C57BL/6J foram tratados com uma única dose de 200 μl de veículo (PBS-5% etanol) ou com uma fração polissacarídica de LM (FP, 100 mg/kg em PBS-5% etanol), i.v., 30 minutos antes da microscopia intravital. (A) Número de células rolando por minuto. (B) Número de células aderidas por 100 μm . Os

resultados são apresentados como média \pm sem (n= 7–16). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.6) **Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz translocação bacteriana no intestino, fígado e sangue de camundongos submetidos à GVHD**

Visto que o tratamento com LM reduziu a resposta inflamatória associada à GVHD envolvendo citocinas, quimiocinas e recrutamento de células, bem como protegeu os órgãos alvo da doença de lesões graves, nosso próximo passo foi avaliar a translocação bacteriana em animais submetidos à doença. No 20º dia após o transplante, foi encontrado uma grande carga bacteriana no lavado peritoneal do grupo GVHD (Figura 17A). A presença de bactérias foi também determinada no fígado e sangue dos animais submetidos à doença (Figura 17B e C). Esses dados podem estar correlacionados com a maior destruição das camadas do intestino (Figura 11A e D) e diminuição da camada de muco (Figura 11B e G) observadas anteriormente. Em contraste, foi observada menor quantidade de bactérias na cavidade peritoneal, sangue e fígado de camundongos submetidos à GVHD e tratados com LM (Figura 17A-C), associada com a melhora geral da graduação histopatológica (Figura 11A e E).

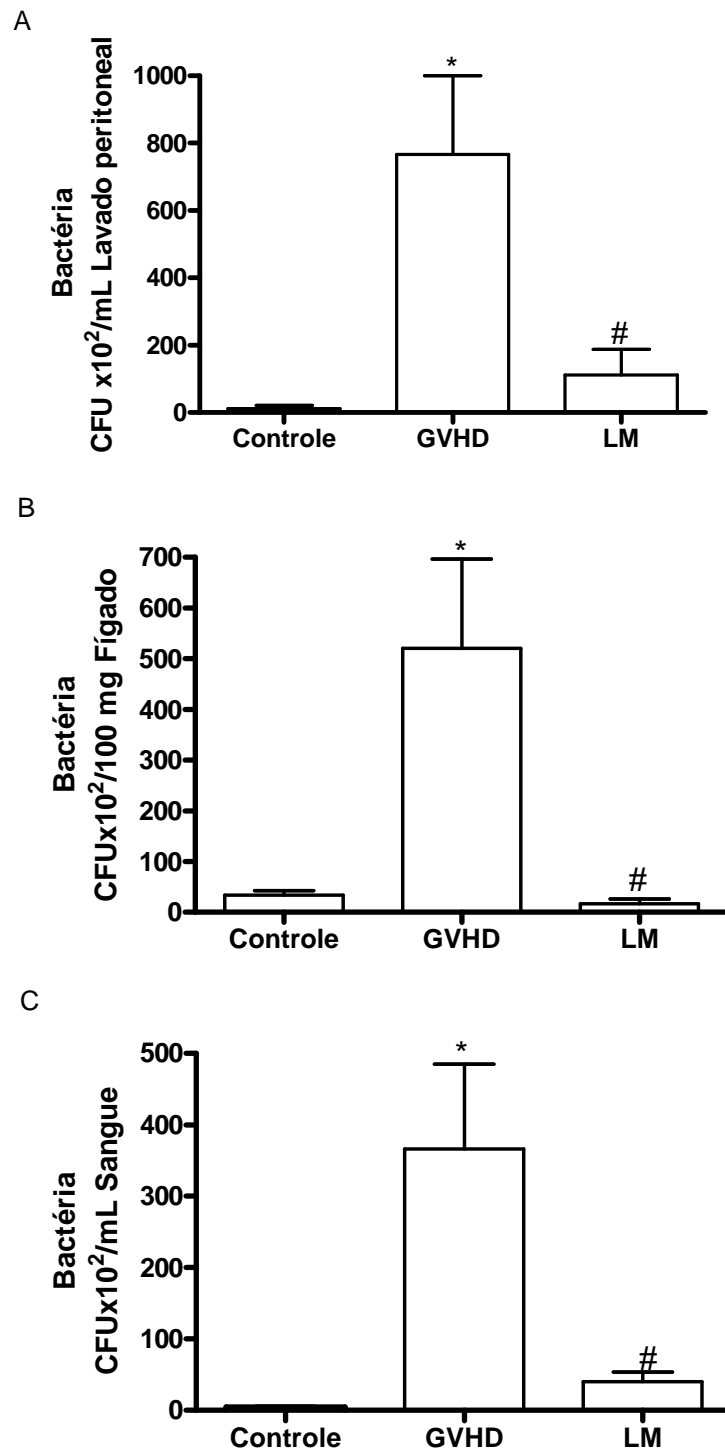


Figura 17. Tratamento com LM inibe translocação bacteriana no intestino, fígado e sangue de animais submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM

na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. No dia 20 após o transplante, os camundongos foram sacrificados e o número de unidades formadoras de colônias (CFU) de bactérias foi verificado na cavidade peritoneal (A), sangue (B) e fígado (C). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 6). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.7) Carbonato de cálcio não está envolvido com a proteção de camundongos submetidos à GVHD e tratados com *Lithothamnion muelleri*.

Apesar de confirmarmos que a fração polissacarídica da alga *L. muelleri* apresenta efeitos anti-inflamatórios na GVHD e diminui o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas intestinais, LM tem um rico conteúdo mineral em sua composição, principalmente carbonato de cálcio (CaCO_3), que representa entre 80-90% de sua biomassa (Dias, 2000). Por isso, os efeitos do CaCO_3 na GVHD, na concentração de 0,9% também foram investigados e comparados às respostas induzidas por *L.muelleri*. Camundongos tratados com carbonato de cálcio apresentaram uma graduação clínica (Figura 18A) e perda de peso semelhante ao grupo GVHD (Figura 18B). Este resultado sugere que o carbonato de cálcio não está envolvido com a proteção de camundongos submetidos à GVHD e tratados com *Lithothamnion muelleri* (Figura 18).

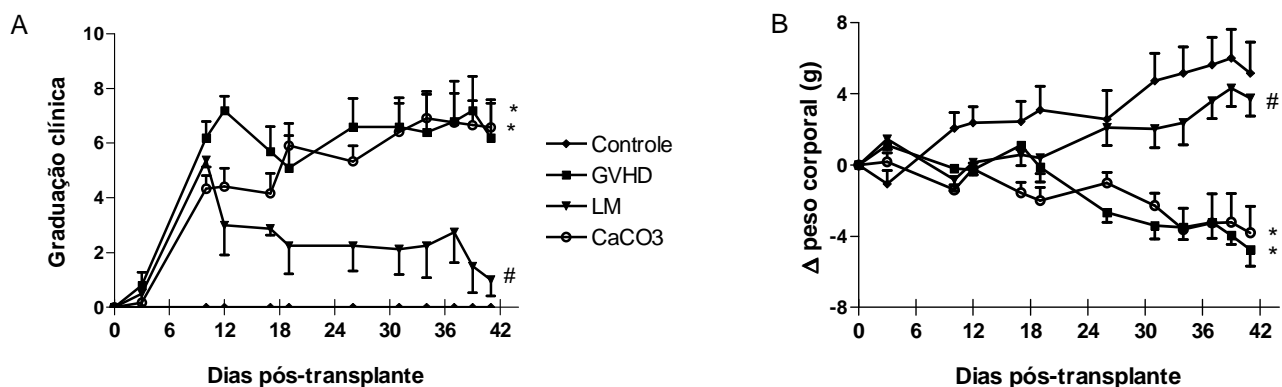


Figura 18. Carbonato de cálcio (CaCO₃) não está envolvido na proteção de camundongos submetidos à GVHD e tratados com LM. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% (Grupo LM) ou CaCO₃ na concentração de 0,9% (Grupo CaCO₃) foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para ocorrência dos sinais clínicos da GVHD (A) e controle do peso corporal (B). Os resultados são apresentados como média ± SEM e os grupos representados como se segue: Grupo Controle (♦, n=6); Grupo GVHD (■, n=7), Grupo LM 1% (▼, n=7) e Grupo CaCO₃ (○, n=7). * e #P < 0.05 quando comparados ao Grupo Controle e Grupo GVHD, respectivamente.

5.8) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz os níveis de IFN- γ e CCL2 no cérebro de camundongos submetidos à GVHD

Estudos prévios descrevem uma incidência de complicações neurológicas de 8% a 42% em receptores de transplante de medula óssea, aumentando o risco de morte desses indivíduos (Siegal e cols., 2007; Saiz e cols., 2010). Por isso, em adição às análises realizadas no intestino e fígado, realizamos uma análise inicial do cérebro de camundongos submetidos à GVHD, estudo até hoje inédito na literatura. Em adição à redução de quimiocinas e citocinas observadas no intestino e fígado de camundongos tratados com LM, o tratamento com esta alga reduziu os níveis cerebrais de IFN- γ (Figura 19A) e CCL2 (Figura 19B). Foi realizada ainda análise dos níveis de TNF- α e CCL3, não detectadas no cérebro de nenhum dos grupos analisados (dados não mostrados) e de CCL5, quimiocina que se manteve elevada nos grupos GVHD e LM quando comparada ao grupo Controle (dados não mostrados).

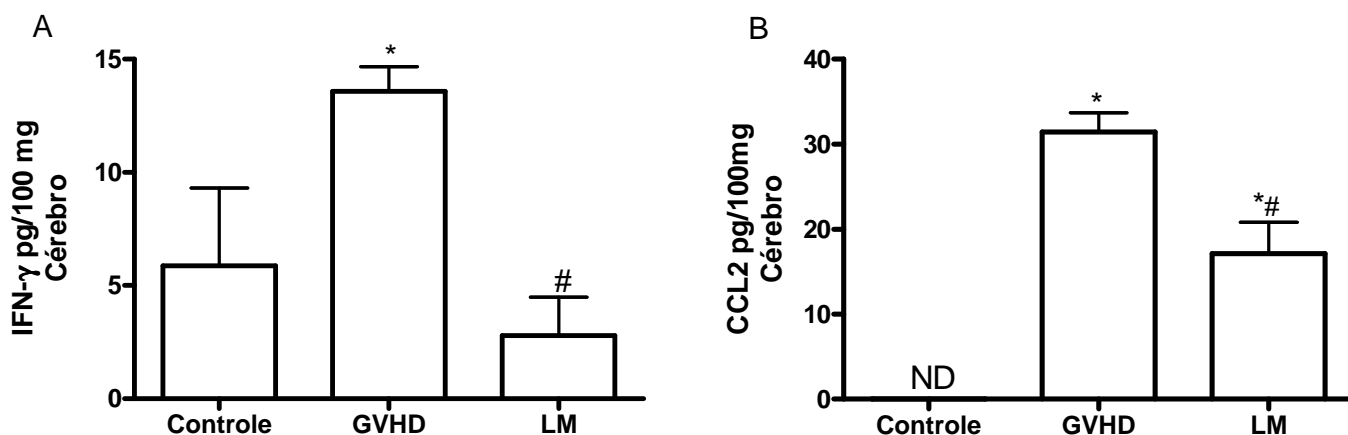


Figura 19. Tratamento com LM reduz a concentração de IFN- γ e CCL2 no cérebro de animais submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. No dia 20 após o transplante, os camundongos foram sacrificados e as concentrações de IFN- γ (A) e CCL2 (B) foram avaliadas em homogenatos de cérebro pelo ensaio de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0,05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.9) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* reduz os níveis de creatinina sérica de camundongos submetidos à GVHD

O rim é outro órgão que também pode ser acometido pela GVHD. A função renal declina de forma aguda na maioria dos pacientes no primeiro mês após o transplante de medula óssea. Esta lesão renal aguda pode persistir e é um fator de risco para o desenvolvimento tardio de doença renal crônica (Abboud e cols., 2012). Diante do exposto, investigamos também o efeito de LM na lesão renal induzida por GVHD.

Camundongos submetidos à GVHD e não tratados apresentaram um aumento da creatinina sérica 3, 10 e 20 dias após o transplante, um indicativo de lesão renal (Figura 20).

O grupo tratado com *L. muelleri* apresentou níveis de creatinina sérica semelhantes ao grupo Controle, sugerindo que o tratamento com LM também preserva a função renal em camundongos submetidos à GVHD.

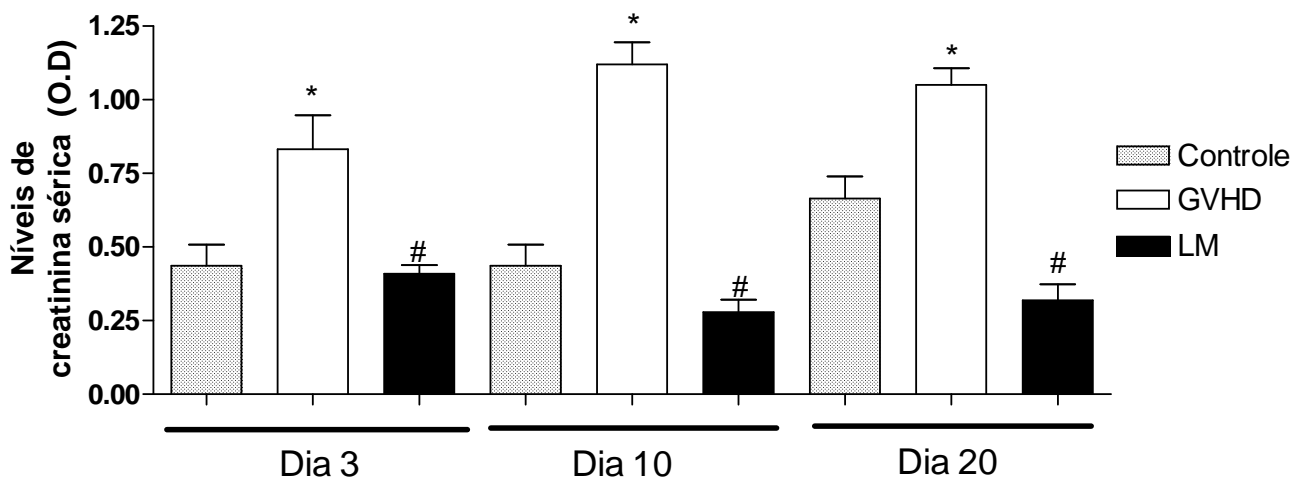


Figura 20. Tratamento com LM preserva a função renal de camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semiallogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após a indução da GVHD, os camundongos foram sacrificados e amostras sanguíneas coletadas para análise dos níveis de creatinina sérica nos dias 3, 10 e 20 dias após o transplante. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 5). * e #P < 0.05 quando comparados ao grupo Controle e grupo GVHD, respectivamente.

5.10) Tratamento com *Lithothamnion muelleri* mantém o efeito do enxerto-versus-tumor (GVT) após indução da GVHD

Após observado que o tratamento com LM regula a resposta inflamatória associada à GVHD, verificamos se a modulação dessa resposta poderia interferir na resposta do enxerto-versus-tumor. Para tanto, células GFP+ P815 foram injetadas i.v. após o transplante de esplenócitos (Dia 0) e os camundongos foram monitorados para sobrevivência a cada dois dias. Um grupo de camundongos, que recebeu apenas o transplante de esplenócitos, sem células tumorais, foi considerado o controle negativo para a curva de sobrevivência e não apresentou mortalidade (Figura 21). Camundongos que receberam apenas células tumorais (grupo P815) apresentaram 100% de letalidade após 24 dias do transplante, confirmando o crescimento do tumor. No 25º dia após o início do experimento, todos os animais do grupo GVHD, que não receberam células tumorais e nenhum tratamento, apresentaram 100% de mortalidade. O grupo GVHD+P815, que recebeu esplenócitos adicionados de células tumorais, tiveram total letalidade no dia 35 após o transplante (Figura 21). Este resultado mostra que o animal com GVHD consegue combater o tumor e sua morte é resultante de danos causados pela doença do enxerto-versus-hospedeiro.

O tratamento com LM reduziu a GVHD sem interferir na resposta benéfica ao tumor, já que camundongos que receberam esplenócitos e células tumorais (GVHD +P815+ LM , 50% de sobrevivência), apresentaram uma porcentagem de sobrevivência semelhante aos animais tratados que receberam apenas esplenócitos (GVHD + LM, 60% de sobrevivência) e mantêm esta porcentagem até 55 dias após a indução do transplante, sendo os animais sobreviventes sacrificados nesta data (Figura 21).

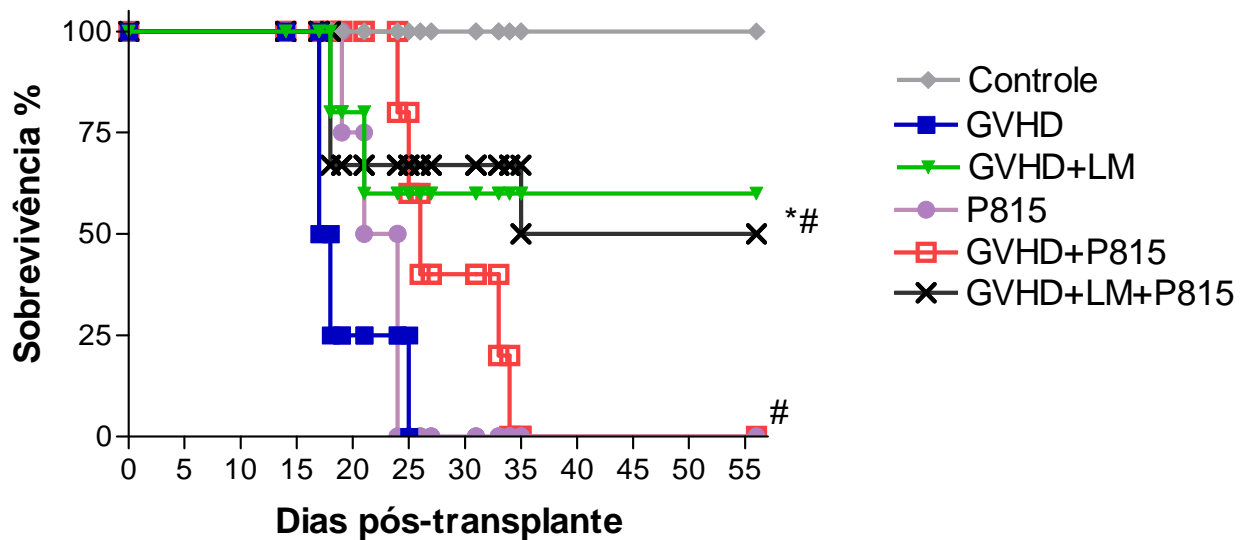


Figura 21. Tratamento com LM não interfere na GVT em camundongos submetidos à GVHD. GVHD foi induzida pela transferência de esplenócitos de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1. Células GFP+P815 foram injetadas i.v em receptores B6D2F1 no dia 0 do transplante. Camundongos que receberam esplenócitos de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e foram denominados como grupo Controle. O grupo P815 recebeu apenas células GFP+P815 e os outros grupos receberam esplenócitos de doadores alogênicos (C57BL/6J) adicionados ou não de células GFP+P815. LM na concentração de 1% foi oferecida na dieta de camundongos WT um dia antes do transplante e mantida até o final do experimento. Após indução da GVHD, os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para sobrevivência. Os resultados são apresentados como média \pm sem e os grupos representados como se segue: Grupo Controle (\blacklozenge , n=6); grupo GVHD (\blacksquare , n=7); grupo GVHD+LM (\blacktriangledown , n=7); grupo P815 (\bullet , n=6); grupo GVHD+ P815 (\square , n=7) e grupo GVHD+LM+P815 (\times , n=6). * e #P < 0.05 quando comparados ao Grupo Controle e Grupo GVHD, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro permanece sendo a maior complicação do transplante de células tronco hematopoiéticas, sendo a sua incidência de 10 a 80%, dependendo dos fatores de risco presentes (Dignan e cols., 2012).

Os corticosteróides, utilizados como primeira linha de tratamento para a GVHD são efetivos em menos de 50% dos pacientes (Martin e cols., 1990) e, por isso, novos agentes têm sido desenvolvidos e investigados tanto para serem utilizados como primeira linha de tratamento como para terapêutica da GVHD refratária a esteróides (Dignan e cols., 2012). Ainda assim, não existe um consenso sobre a melhor estratégia para manejo da doença do enxerto-versus-hospedeiro, sendo de grande relevância o estudo de terapias alternativas que auxiliem no tratamento da GVHD (Westin e cols., 2011; Dignan e cols., 2012). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com a alga *Lithothamnion muelleri* (LM) no controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro em camundongos.

Nós observamos neste trabalho que o tratamento com a alga *Lithothamnion muelleri* (1) aumentou a sobrevivência dos animais submetidos à GVHD com diminuição importante dos sinais clínicos da doença, (2) diminuiu a lesão dos órgãos alvo, (5) reduziu a produção de citocinas e quimiocinas nestes órgãos e (4) diminuiu o acúmulo de macrófagos nos mesmos. Além disso, (6) inibiu o recrutamento de leucócitos para o intestino e (7) impediu a translocação bacteriana para o intestino, fígado e sangue. Adicionalmente, (8) preservou a função renal e (9) diminuiu os níveis cerebrais da citocina IFN- γ e da quimiocina CCL2. De maneira importante, reduziu a resposta inflamatória associada à GVHD, mas (10) não prejudicou a resposta benéfica do enxerto-versus-tumor.

O aumento da sobrevivência dos animais submetidos à GVHD e tratados com *L. muelleri* observado em nosso trabalho foi associado a uma menor graduação clínica da doença. O efeito protetor de LM na GVHD foi confirmado quando testamos esta alga num modelo mais grave da doença, induzida a partir da irradiação total e consequente mieloablação dos camundongos receptores, onde obtivemos resultados semelhantes aos observados no modelo de GVHD induzido por ablação parcial da medula. Associada à melhora clínica, observamos também que LM diminuiu a lesão no intestino e fígado, órgãos alvo da GVHD, o que gerou uma menor graduação histopatológica destes órgãos em animais tratados com a alga em estudo.

A redução de lesão intestinal observada nos camundongos tratados com LM foi associada à diminuição do infiltrado inflamatório na camada muscular e serosa e à preservação da camada de muco no intestino. A camada de muco é considerada a primeira linha de defesa entre bactérias presentes no lúmen intestinal e as células do hospedeiro e também funciona como área para a interação inicial entre microrganismos-hospedeiro (Lang e cols., 2007; Johansson e cols., 2011; Barnett e cols., 2012). A degradação de mucinas (principais componentes do muco) por bactérias é muitas vezes considerada uma fase inicial na patogênese de doenças intestinais uma vez que pode causar um distúrbio na proteção das superfícies mucosas do hospedeiro (Derrien e cols., 2010; Johansson e cols., 2011; Barnett e cols., 2012). Dessa forma, a preservação da camada de muco intestinal em animais tratados com LM pode ter contribuído para a efetiva proteção do intestino. Estudos realizados por Aslam e cols., (2010) com a alga *Lithothamnion calcareum*, pertencente ao mesmo gênero da alga *L. muelleri*, corroboram com os resultados obtidos em nosso trabalho, onde foi observada redução da inflamação e lesão intestinal em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura.

Além da redução de lesão intestinal, observamos que o tratamento com LM protegeu também o fígado, outro órgão alvo da GVHD. Neste órgão, o tratamento com a alga *Lithothamnion muelleri* diminuiu o acúmulo de células inflamatórias e a necrose de hepatócitos, preservando dessa forma a arquitetura tecidual do fígado. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo realizado por Hong e cols., (2011), onde observaram uma diminuição da necrose de hepatócitos e consequente proteção contra lesão hepática em animais submetidos a uma dieta rica em gordura e tratados com *Lithothamnion calcareum* e *Lithothamnion coraloides*.

A proteção intestinal e hepática em animais tratados com LM vista pela menor graduação histopatológica e o aumento da sobrevida destes animais foi associado à redução dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias relacionadas à GVHD. As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , são as principais contribuintes para a doença (Robb & Hill, 2012), sendo que a expressão aumentada das mesmas precede as manifestações clínicas da doença (Koide e cols., 1997) e estão relacionadas a uma síndrome sistêmica de perda de peso, diarreia, alterações na pele e alta mortalidade (Piguet e cols., 1987; Baker e cols., 1995; Koide e cols., 1997; Schroeder & DiPersio, 2011). Isto corrobora com os nossos resultados uma vez que observamos um aumento dos níveis destas citocinas a partir do 10º dia após o transplante em animais submetidos à GVHD, coincidindo com o aparecimento dos sinais clínicos da doença (perda de peso, eriçamento e perda da vitalidade dos pêlos, diarreia, ocorrência de sangue nas fezes, apatia e postura do tronco em flexão) e posterior morte dos animais. Já se sabe que quantidades elevadas de IFN- γ , contribuem para o dano intestinal por diferentes vias, incluindo efeitos citopáticos diretos da citocina no trato gastrointestinal e ativação de monócitos/macrófagos que passam a secretar quantidades de linfotóxina e TNF- α , potencializando o dano ao órgão (Robb & Hill, 2012). Nós observamos neste trabalho, um

aumento de TNF- α após 10 dias do transplante, sendo expressivamente maior no 20^o dia após o transplante. Estes achados são importantes, uma vez que assim como o IFN- γ , o TNF- α tem um papel importante em todas as fases da fisiopatologia da GVHD, desde a fase inicial de ativação das células apresentadoras de antígeno e efeitos diretos da citocina em lesar os órgãos alvo, até efeitos indiretos no aumento da proliferação de linfócitos T citotóxicos e infiltrado inflamatório através do recrutamento de mononucleares, no curso da GVHD intestinal, intensificando o dano a este órgão (Brown & Thiele, 2000; Levine, 2011). A importância destas citocinas na GVHD intestinal foi comprovada em estudos que demonstram que camundongos receptores de células doadas deficientes em IFN- γ não desenvolvem GVHD no intestino (Ellison e cols., 2003) e que a neutralização de TNF- α inibe a ocorrência de apoptose e atrofia da mucosa intestinal (Stuber e cols., 1999), prevenindo a GVHD aguda (Ferrara, 2005). Dessa forma, a não alteração dos níveis de IFN- γ e TNF- α no intestino de animais submetidos à GVHD e tratados com *L. muelleri*, permanecendo em níveis semelhantes aos observados no grupo Controle durante todo o curso da doença pode ter contribuído para a proteção deste órgão. Apesar de o tratamento com LM não ter diminuído os níveis de IFN- γ no fígado, observamos uma redução nos níveis de TNF- α , o que pode estar relacionado à proteção hepática observada nos animais tratados. Assim, a inibição da produção e liberação de IFN- γ e TNF- α em animais tratados com LM pode estar relacionada com a menor graduação clínica da doença e maior sobrevida dos animais.

O tratamento com *Lithothamnion muelleri* também foi eficiente em reduzir os níveis de CCL2 e CCL5 no intestino e de CCL3 e CCL5 no fígado destes animais, vinte dias após o transplante. Estas quimiocinas são consideradas importantes na patogênese da GVHD ao promover a migração de células doadas a órgãos alvo durante o desenvolvimento da doença (Castor e cols., 2012b). A produção de CCL2, CCL3 e CCL5 pode ser estimulada ainda por

TNF- α e IFN- γ (Schroeder e DiPersio, 2011; Castor e cols., 2012b). A importância de CCL2 na patogênese da GVHD foi demonstrada em um estudo onde a expressão de CCR2, receptor desta quimiocina, aumentou a ativação de células CD4+ no baço de animais com doença do enxerto-versus-hospedeiro, modificando um perfil de doença crônica para aguda e promoveu a morte de camundongos submetidos à doença (Ichiba e cols., 2003). Outro estudo realizado por nosso grupo observou níveis aumentados de CCL2 desde as fases iniciais da GVHD no intestino (Castor e cols., 2011). Além disso, CCR2 também atua na ativação e migração de linfócitos T CD8+ para os órgãos alvo da GVHD (Terwey e cols., 2005). Com relação à CCL3, estudos têm demonstrado que a ausência de CCL3 nas células doadas ou o bloqueio farmacológico de seu receptor também reduz a mortalidade e lesão em órgãos alvo associados à doença do enxerto-versus-hospedeiro diminuindo o acúmulo de linfócitos T CD4+ e CD8+ no baço e intestino, além de inibir o recrutamento de macrófagos para o intestino (Serody e cols., 2000; Castor e cols., 2010). De forma interessante, a neutralização de CCL3 levou a uma redução dos níveis de CCL5 no intestino de camundongos com GVHD, sugerindo que CCL3 modula os níveis de CCL5 neste órgão (Castor e cols., 2010). Outro resultado que confirma a participação da CCL5 na patogênese da GVHD é a superexpressão de seu receptor, CCR1, em camundongos com a doença. Por outro lado, a ausência desse receptor está associada à maior sobrevivência, diminuição dos sinais clínicos da GVHD, menor liberação de TNF- α e IFN- γ e menor recrutamento de células inflamatórias, como linfócitos T e células mononucleares para órgãos alvo da GVHD (Choi e cols., 2007). Diante do exposto, a redução de IFN- γ e TNF- α associada à redução de CCL2, CCL3 e CCL5 em animais tratados com *L. muelleri* pode ter contribuído para a proteção de órgãos alvo, diminuição dos sinais clínicos e reduzida mortalidade associados à GVHD.

Dentre as células inflamatórias recrutadas pelas citocinas e quimiocinas que participam da GVHD, merece destaque o macrófago, que apresenta função de célula fagocitária, participa da apresentação de antígenos para linfócitos T e expressa numerosos receptores para citocinas pró-inflamatórias, além de produzir mediadores inflamatórios importantes como espécies reativas de oxigênio e várias citocinas, incluindo TNF- α (Fieren, 2012). Em nosso estudo, verificamos que animais submetidos à GVHD apresentaram um aumento do infiltrado inflamatório no intestino e fígado observado na histologia. Esta observação foi confirmada por um ensaio enzimático que demonstrou, por quantificação indireta, um aumento expressivo do influxo de macrófagos nestes órgãos. Estes resultados podem estar associados à grande liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias que observamos nestes animais anteriormente, as quais participam do recrutamento de células inflamatórias e são essenciais para a quimioatração dos macrófagos e células T, que podem liberar uma quantidade ainda maior destas quimiocinas, perpetuando o processo inflamatório (Serody e cols. 1999 e 2000, Wysock e cols. 2005, Jaksch e Mattson 2005, Choi e cols. 2007, Bouazzaoui e cols. 2009, Castor e cols., 2010; Castor e cols., 2011; Castor e cols., 2012a, Castor e cols., 2012b). Por outro lado, o tratamento com LM reduziu o infiltrado inflamatório e o acúmulo de macrófagos no intestino e fígado dos animais submetidos à GVHD. Este resultado é coerente com a diminuição das citocinas e quimiocinas observadas nestes animais e preservação da arquitetura tecidual destes órgãos. Nós não observamos neste trabalho a participação dos neutrófilos na patogênese da GVHD, o que é condizente com estudos anteriores que demonstram que o neutrófilo não é o principal tipo celular envolvido na doença (Wysock e cols., 2005; Jaksch e Mattson, 2005).

Lithothamnion muelleri tem em sua composição principalmente carbonato de cálcio. Um estudo recente proposto por Aslam e cols. (2010) com uma alga do gênero *Lithothamnion* demonstrou a sua capacidade em suprimir a formação de pólipos intestinais e reduzir a

inflamação gastrointestinal induzida em animais submetidos a uma dieta rica em gordura. Este grupo de pesquisa demonstrou que o provável mecanismo que explica o efeito protetor desta alga é a ação do cálcio que promove a diferenciação do tecido do cólon humano e modula a função estromal (Aslam e cols., 2011). Nesse contexto, nós avaliamos se o cálcio também estaria participando do efeito protetor observado no tratamento com LM em camundongos submetidos à GVHD. Em nosso estudo, nós observamos que o cálcio não participa da proteção da GVHD em camundongos uma vez que a mortalidade e os sinais clínicos da doença do grupo que recebeu uma dieta rica em CaCO_3 foram similares ao grupo não tratado.

Além do carbonato de cálcio, *Lithothamnion muelleri* tem em sua composição polissacarídeos sulfatados, que apresentam propriedades anti-inflamatórias como demonstrado recentemente por Soares e cols., (2012). Visto que observamos um aumento no influxo de macrófagos para os órgãos alvo da GVHD e que o influxo de células inflamatórias exerce um papel importante na fase efetora da doença, interferindo de maneira direta na mortalidade (Lu e cols., 2010; Ferrara e cols., 2005, 2006 e 2009), hipotetizamos que os principais constituintes bioativos presentes nos polissacarídeos de LM seriam o principal mecanismo de proteção observada na GVHD. Nós observamos que a fração polissacarídica da alga foi responsável pela redução do rolamento e adesão de leucócitos no intestino. Estes resultados são coerentes com o estudo realizado por Soares e cols. (2012) que demonstrou uma redução de aproximadamente 90% do rolamento de leucócitos induzidos por LPS após a injeção intravenosa de frações de LM em camundongos.

A proteção contra lesões hepáticas e intestinais graves em animais submetidos à GVHD e tratados com LM observada em nosso trabalho torna-se de grande relevância, uma vez que 50% dos pacientes que desenvolvem GVHD apresentam lesões no fígado e 54% apresentam lesões intestinais (Robb & Hill, 2012). Embora lesões hepáticas causem

alterações clínicas importantes como hepatomegalia, disfunção de enzimas hepáticas e hiperbilirrubinemia (Tuncer e cols., 2012), evidências clínicas e experimentais sugerem que o intestino é o principal órgão relacionado à fisiopatologia da GVHD, participando da amplificação da doença a nível sistêmico (Hill & Ferrara, 2000). Isto se dá porque a parede intestinal lesada possibilita a translocação bacteriana, gerando posterior sepse que é uma das principais causas de morte dos pacientes que desenvolvem GVHD (Irani e cols., 2008). A intensa lesão intestinal em camundongos submetidos à GVHD observada em nosso trabalho através da graduação histopatológica aumentada e aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, associada ao aumento do infiltrado inflamatório e recrutamento de macrófagos para o órgão, além do aumento do rolamento e adesão de leucócitos em vênulas intestinais justifica a translocação bacteriana aumentada nestes animais. Uma vez rompida a barreira intestinal e iniciada a translocação bacteriana, o recrutamento de macrófagos pode ser intensificado, já que macrófagos possuem receptores para LPS e fazem parte dos mecanismos de defesa da mucosa contra agentes patogênicos bacterianos prejudiciais, migrando para os locais de infecção na tentativa de eliminar o patógeno (Smith e cols., 2011). Por outro lado, o tratamento com LM causou uma redução da translocação bacteriana para o peritônio de animais submetidos à GVHD, uma vez que o intestino é protegido da doença. Lesões da parede intestinal estão associadas à translocação de bactérias para o fígado inicialmente e, posteriormente, para a corrente sanguínea, causando uma infecção sistêmica (Jones e cols.1971, Beelen e cols.1992, Beelen e cols. 1999, Irani e cols. 2008). Em nosso trabalho, observamos que o tratamento com LM também reduziu a translocação bacteriana no fígado e sangue de camundongos submetidos à GVHD, o que pode ser associado à redução da translocação bacteriana para o peritônio (a menor translocação de bactérias para o peritônio provavelmente diminuiu a disseminação de bactérias para o fígado e a corrente sanguínea). A importância da translocação bacteriana na doença foi comprovada

através de estudos animais que mostraram que o uso de antibióticos para eliminação das bactérias intestinais após o transplante de medula óssea previne a morte de camundongos e a reconstituição da microbiota intestinal provoca a morte dos mesmos (Bekkum e cols., 1974). Atualmente, vêm sendo utilizadas terapias que buscam reduzir a translocação bacteriana e consequente sepse em indivíduos submetidos ao transplante de medula óssea, como o uso de rifaximin, um antibiótico que elimina bactérias gram-negativas intestinais (Blazar e cols., 2012). Nesse contexto, a capacidade de LM em reduzir a translocação bacteriana nos órgãos alvo da doença contribuiu para a proteção da GVHD nos camundongos tratados, confirmada pela diminuição dos sinais clínicos da doença e redução da mortalidade no grupo que recebeu LM.

Hong e cols., (2011) mostraram que o tratamento com *L. calcareum* e *L. coraloides* protege contra lesão hepática induzida por CCL4 através de sua atividade antioxidante, reduzindo espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e indução de CYP2E1 e produção aumentada de glutatona e catalase. Esta é outra hipótese que poderia explicar a proteção em órgãos alvo da GVHD observada em nosso trabalho. Várias células sanguíneas, incluindo eritrócitos, neutrófilos e linfócitos, estão sob estresse oxidativo na GVHD, sugerindo que o tratamento com antioxidantes pode modular as graves consequências da doença (Amer e cols., 2007). Dessa forma, estudos que explorem a capacidade antioxidante de LM na GVHD podem ser interessantes para contribuir na compreensão do efeito dessa alga em controlar a resposta inflamatória associada à doença do enxerto-versus-hospedeiro.

NF-kappa B (NF-kB) é um fator de transcrição que controla a expressão de importantes genes que medeiam a resposta imune e inflamatória. Já se sabe que NF-kB tem um importante papel na fisiopatologia da GVHD e sua inibição está associada à proteção da doença, tornando-se uma interessante estratégia terapêutica para redução da gravidade da

GVHD (Vodanovic-Jankovic e cols., 2006). Gormam e cols. (2012) demonstraram recentemente que o tratamento com *Lithothamnion coralloides* inibe a via de sinalização de NF- κ B, gerando como consequência, a redução da expressão de ciclooxigenase-2 (enzima importante nos processos inflamatórios) em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano. Nesse contexto, a ação de *Lithothamnion muelleri* em inibir a via de NF- κ B poderia ser um outro mecanismo que estaria contribuindo para a proteção da GVHD observada em animais tratados com esta alga, sendo interessante a realização de estudos posteriores que enfoquem o efeito da LM nesta via.

Além dos órgãos alvo da GVHD, outros órgãos podem ser afetados, como o rim e o cérebro (Abboud e cols., 2012; Siegal e cols., 2007). A função renal declina de forma aguda na maioria dos pacientes no primeiro mês após o transplante de medula óssea. Esta lesão renal aguda pode persistir e é um fator de risco para o desenvolvimento tardio de doença renal crônica (Abboud e cols., 2012). Cerca de 20% dos pacientes que sobrevivem ao transplante de células tronco hematopoiéticas desenvolvem doença renal crônica, tornando-se um significativo problema de saúde pública (Abboud e cols., 2012). Em casos mais graves da doença, quando ocorre o desenvolvimento de abscesso renal bilateral, apenas o transplante dos rins é capaz de restabelecer a saúde do indivíduo (Abboud e cols., 2012; Lieber e cols., 2012). Camundongos submetidos à GVHD e não tratados apresentaram um aumento da creatinina sérica em todos os tempos analisados da doença, o que pode indicar lesão renal. O grupo tratado com *L. muelleri* apresentou níveis de creatinina sérica semelhantes ao grupo Controle, sugerindo que o tratamento com LM também preserva a função renal em camundongos submetidos à GVHD.

Outro resultado interessante foi a redução dos níveis cerebrais de IFN- γ e CCL2 observada em camundongos tratados com LM. Pacientes submetidos ao transplante de medula

óssea apresentam riscos de complicações relacionados ao sistema nervoso central, devido a diferentes fatores como citopenias, intoxicação por medicamentos, infecções e desenvolvimento da doença do enxerto-versus-hospedeiro. Estudos em animais defendem que o cérebro é também um órgão alvo da GVHD (Hickey & Kimura, 1987; Padovan e cols., 2001) e a incidência de complicações neurológicas varia de 8% a 42% nos indivíduos receptores, aumentando o seu risco de morte (Siegal e cols., 2007; Saiz e cols., 2010). Não existem até o momento, trabalhos que explorem o perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas no cérebro de pacientes que desenvolvem GVHD, porém já se sabe que o envolvimento do sistema nervoso na doença é caracterizado pelo desenvolvimento de vasculite, encefalite linfocitária focal (causada principalmente por linfócitos T de origem do doador) e ativação da micróglia (Kamble e cols., 2007). Em um recente estudo realizado por Ryan e cols. (2011), o tratamento com a alga *Lithothamnion corallioides*, pertencente ao mesmo gênero de LM, inibiu a secreção de TNF- α e interleucina-1 beta de células da glia isoladas de rato que foram colocadas em cultura e estimuladas com LPS, impedindo efeitos deletérios de inflamação excessiva em células nervosas. Este resultado associado à redução de IFN- γ e CCL2 no tecido cerebral de animais com GVHD e tratados com LM obtido em nosso trabalho, evidencia uma possível atividade anti-inflamatória de algas do gênero *Lithothamnion* também no cérebro, demonstrando a relevância de estudos posteriores que explorem essa propriedade de LM, já que a redução de inflamação de células nervosas pode estar participando da sobrevida aumentada observada em animais submetidos à GVHD e tratados com *L. muelleri*.

A capacidade de linfócitos infundidos em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas em reagir contra células tumorais é denominada como efeito do enxerto-versus-tumor (graft-versus-tumor - GVT) (Johnson e cols., 1996). A doença do enxerto-versus-hospedeiro, a principal complicação do transplante de células tronco

hematopoiéticas, está intimamente relacionada com o efeito desejável do GVT, importante para eliminar a doença remanescente (Dazzi e cols., 1999; Porter & Antin, 1999; Xia e cols., 2006). Várias terapias que são efetivas em prevenir a GVHD comumente levam à diminuição da atividade de GVT inviabilizando suas aplicações efetivas (Horowitz e cols., 1990; Matejkova e cols., 2008; Li e cols., 2009). Nós observamos neste trabalho que o tratamento com LM inibiu a GVHD mas não interferiu com a habilidade do enxerto em combater o tumor, preservando o GVT, já que camundongos que receberam esplenócitos e células tumorais apresentaram uma porcentagem de sobrevivência semelhante aos animais tratados que receberam apenas esplenócitos. Compostos de algas vermelhas apresentam propriedades antitumorais comprovadas (Zhou e cols., 2005) e um estudo recente demonstrou que o tratamento com *Lithothamnion calcareum* protegeu contra lesões proliferativas neoplásicas e pré-neoplásicas no fígado, inibindo a formação de tumores hepáticos (Aslam e cols., 2012). Dessa forma, a alga *L. muelleri* pode conter também propriedades antitumorais que favoreçam o combate às células tumorais, beneficiando a resposta do enxerto-versus-tumor. Estes resultados que foram obtidos são interessantes para aplicação futura de uma terapia com LM que reduza a doença do enxerto-versus-hospedeiro sem interferir na capacidade do paciente em combater as células tumorais.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo observamos que o tratamento com *L. muelleri em camundongos com GVHD* reduziu a letalidade, os sinais clínicos e lesão de órgãos alvo associados com redução da resposta inflamatória. De maneira importante, o tratamento com LM reduziu a GVHD, porém não interferiu na resposta do enxerto-versus-tumor. Esses resultados evidenciam a alga *Lithothamnion muelleri* como uma nova candidata com potencial aplicação terapêutica no tratamento da GVHD em humanos.

8. REFERÊNCIAS

Abboud, I., Peraldi M. N. , Hingorani S. (2012). Chronic kidney diseases in long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: monitoring and management guidelines. *Semin Hematol.* 49(1):73-82.

Amer, J., Weiss, L., Reich, S., Shapira, M. Y. et al. (2007). The oxidative status of blood cells in a murine model of graft-versus-host disease. *Ann Hematol.* 86:753–758.

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.

Aslam M.N., Paruchuri T., Bhagavathula N., and Varani J. (2010). A mineral-rich red algae extract inhibits polyp formation and inflammation in the gastrointestinal tract of mice on a high-fat diet. *Integr. Cancer Ther.* 9, 93-99.

Aslam M.N., Bergin, I., Naik, M., Hampton, A., Allen, R., Kunkel, S. L., Rush, H., Varani J. (2012) A Multi-Mineral Natural Product Inhibits Liver Tumor Formation in C57BL/6 Mice. *Biol Trace Elem Res* 147:267–274.

Ball L.M., Egeler R.M. (2008). On behalf of the EBMT Pediatric Working Party Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplantation.* 41, S58–S64.

Backer M.B., Altman N.H., Podack E.R., Levy R.B. (1996) The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med.*183:2645-2656.

Barahona, L. F. Rorrer, G. L. (2003). Isolation of halogenated monoterpenes from bioreactor cultured microplantlets of macrophytic red algae *Ochtodes secundiramea* and *Portieria hornemannii*. *J Nat Prod* 66: 743-751.

Barcelos, L. S., A. Talvani, A. S. Teixeira, G. D. Cassali, S. P. Andrade, and M. M. Teixeira (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm.Res.* 53: 576–584.

Barnett, A. M., Roy, N. C., Mc Nabb, W. C., Cookson, A. L. (2012). The interactions between endogenous bacteria, dietary components and the mucus layer of the large bowel. *Food Funct.* 27;3(7):690-9.

Beelen, D.W., Elmaagacli, A., Muller, K.D., Hirche, H., Schaefer, U.W.(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 3275.

Beelen, D. W., Haralambie, E., Brandt, H., Linzenmeier, G., Muller, K. D., Quabeck, K., Sayer, H. G., Graeven, U., Mahmoud, H. K., Schaefer, U. W. (1992) Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 80, 2668–2676.

van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. (1974) Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *Journal of the National Cancer Institute*. 52(2):401–404.

Bellavite, P, Conforti, A., Piasere, V., Ortolani, R. (2005). Immunology and homeopathy. Historical background. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2:441–52.

Blazar, B. R., Murphy, W. J. & Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology* 12, 443–458.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T. ; Prinsep, M. R. (2006). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v. 23, p. 26-78.

Bouazzaoui, A., Spacenko, E., Muller, G., Miklos, S., Huber, E., Holler, E., Andreesen, R., Hildebrandt, G. C. (2009). Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease. *Genes Immun*. 10, 687–701.

Boubali, S., Liopeta, K., Virgilio, L., Thyphronitis, G., Mavrothalassitis, G., Dimitracopoulos, G., Paliogianni, F. (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates IL-10 production by human T lymphocytes: A distinct target in the calcium dependent pathway. *Mol Immunol*. 52(2):51-60.

Brown, G. R., Thiele D. L. (2000). T-Cell Activation and Differentiation Are Regulated by TNF During Murine DBA/2 3B6D2F1 Intestinal Graft-Versus-Host Disease. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 20, No. 5.

Castor, M. G., Rezende, B., Resende, C. B., Alessandri, A. L., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Arantes, R. M., Souza, D. G., Silva, T. A., Proudfoot, A. E., Teixeira, M. M., Pinho, V. (2010) The CCL3/macrophage inflammatory protein-1-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. *J. Immunol*. 184, 2646–2654.

Castor, M. G. M., Rezende, B., Bernardes, P. T. T., Vieira, T. A., Arantes, R. M. E., Souza, D. G., Silva, T. A., Teixeira, M. M., Pinho, V. (2011) PI 3 K controls leukocyte recruitment, tissue injury and lethality in a model of graft versus host disease in mice. *J. Leukoc. Biol*. 89, 955–964.

Castor, M. G. M., Pinho, V., Teixeira, M. M. (2012a). The Role of Chemokines in Mediating Graft Versus Host Disease: Opportunities for Novel Therapeutics. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 23.

Castor, M. G., Rezende, B. M., Resende, C.B., Bernardes, P.T., Cisalpino, D., Vieira, A.T., Souza, D.G., Silva, T.A., Teixeira, M.M., Pinho, V. (2012b) Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. *J Leukoc Biol.* 91(4):629-39.

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. (2007) CCR1:CCL5 (RANTES) receptor ligand interactions modulates allogeneic T cell responses and reduces graft-versus-host disease following stem cell transplantation. *Blood.* 110:3447–3455.

Colson YL, Christopher K, Glickman J, Taylor KN, Wriarth 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.

Cooke, K. R. et al. (1998). Tumor necrosis factor- α production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 102, 1882–1891.

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

Dame, M. K., Veerapaneni, I., Bhagavathula, N., Naik, M., Varani, J. (2011) Human colon tissue in organ culture: calcium and multi-mineral-induced mucosal differentiation. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal* .47:32–38.

Dazzi, F., Szydlo, R.M. & Goldman, J.M. (1999). Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant: where we now stand. *Experimental Hematology*, 27, 1477±1486.

Derrien, M., et al. (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1:254–268.

Devergie, A., Janin, A., Apperley, J., Gluckman, E., e cols. (1999) Graft versus host disease. *Blood and marrow transplantation.* revised edition . European School of Haematology, p.130-147.

Dias, C.T.M. (2000) Granulados Bioclásticos - Algas Calcárias. Brazilian Journal of Geophysics, v.8, p.307-318.

Dignan, F. L., Clark, A., Amrolia, P., Cornish, J., Jackson, G., Mahendra, P. e cols. (2012) Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. British Journal of Haematology. 158(1), 30–45.

El-Hayek, J. M., Rogers, T. E., Brown, J. R. (2005). The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8 T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. J. Leukoc. Biol. 78, 1001–1007.

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

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

Faulkner, D.J. (2000). Marine natural products. Natural Product Report 17: 1-57.

Ferrara, J.L., Yanik, G. (2005). Acute graft versus host disease: Pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. Clin Adv Hematol Oncol 3: 415–419, 428.

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

Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. Lancet 373, 1550 –1561.

Fieren , M. W. (2012) The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. Mediators Inflamm., 1450-1462.

Goker, H., Hanznedaroglu, I. C., Chao, N. J. (2001). Acute graft-versus- host disease: pathobiology and management. Exp. Hematol. 29, 259 –277.

Gorman, D. M., Carroll, C., Carmody, R. J. (2012) SHORT COMMUNICATION Evidence that Marine-derived, Multi-mineral, Aquamin Inhibits the NF-kB Signaling Pathway In Vitro. Phytother. Res. 26: 630–632

Gross, H., Goeger, D. E., Hills, P., Mooberry, S. L. e cols. (2006) Lophocladines, bioactive alkaloids from the red alga Lophocladia sp. J. Nat. Prod. v.69 (4), p.640–644.

Hickey WF, Kimura H. Graft-vs-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T-lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2082–2086.

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

Hill G.R., Ferrara J.L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 95:2754–2759.

Hong, Il-Hwa, Ji, H., Hwa, Sung-Yong et al. (2011). The Protective Effect of ENA Actimineral Resource A on CCl₄ -Induced Liver Injury in Rats. *Mar Biotechnol*. 13:462–473

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.(1961) Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. Lond*, n. 154, p. 532-9.

Ichiba, T., Teshima, T., Kuick, R., Misek, D. E., Liu, C., and Takada, Y. (2003). Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. *Blood* 102, 763–771.

Irani, J. L., Cutler, C. S., Whang, E. E., Clancy, T. E., Russel, S., Swanson, R. S., Ashley S. W., Zinner, M. J., Raut, C. P. (2008) Severe acute gastro-intestinal graft-vs host disease: an emerging surgical dilemma in contemporary cancer care. *Arch. Surg*. 143, 1041–1045.

Jacobsohn, D. A., Vogelsang, G. B. (2004). Anti-cytokine therapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Curr. Pharm. Des*. 10, 1195–1205.

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. , Ewart, H. S. (2011). Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs*. 9(2): 196–223.

Jaksch M., Mattsson J. (2005) The pathophysiology of graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*. 61:398-409.

Johansson, M. E. V., et al. (2011) Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci* 68:3635–3641.

Johnson B. D., Hanke C. A., Truitt R. L. (1996). The graft-versus-leukemia effect of post-transplant donor leukocyte infusion. *Leuk. Lymphoma* 23, 1–9.

Jones, J. M., Wilson, R., Bealmeair, P. M. (1971) Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. *Radiat. Res.* 45, 577–588.

Kamble, R. T., Chang, C. C., Sanchez, S., Carrum G. (2007). Central nervous system graft-versus-host disease: report of two cases and literature review. *Bone Marrow Transplantation.* 39, 49–52.

Kaminogawa, S., Nanno, M. Modulation of immune functions by foods (2004). *Evid Based Complement Alternat Med.* 1:241–50.

Kittan, N. A., Hildebrandt, G. C. (2010) The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft-versus-host disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* v. 341, p.97-120.

Koide, S., McVay, L.D., Frankel, W.L., Betling, C.A., Zhou, E.D., Shimada, T., Zhang, W., Rombeau, J.L. (1997). Increased expression of tissue cytokines in graft-versus-host disease after small bowel transplantation in the rat. *Transplantation.* 64:518-24.

Krenger, W., G. R. Hill, and J. L. Ferrara. (1997). Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 27: 553–558.

Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Brinson YS, Ferrara JL. (1999) Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood.* 15;94(2):825-31.

Lang, T., Hansson, G. C., Samuelsson, T. (2007). Gel forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:16209–16214.

Levine, J. E. (2011) Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol.* 93(5):571-7.

Li, J.M., Giver, C.R., Lu, Y., Hossain, M.S., Akhtari, M., Waller, E.K.(2009) Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy.* 1(4):599-621.

Lieber, J., Hauch, H., Lang, P., Handgretinger, R., Blumenstock, G., Seitz, G., Warmann, S.W., Fuchs, J. (2012). Surgical management of stem cell transplantation-related complications in children. *Pediatr Transplant.* 16(5):471-9.

Lu, Y., Waller, E.K. (2009). Dichotomous role of interferon-gamma in allogeneic bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 15(11):1347-1353.

Mapara, M. Y., Leng, C., Kim, Y., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A., Sykes, M. (2006) 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.

Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*. 1990;76:1464-1472.

Martin,P.J.J., Rizzo, D., Wingard, J. R., Ballen, K. et al. (2012). First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012.

Matejková, E., Ocadlíková, D. et al. (2008). Selective depletion of alloreactive T cells and study of anti-tumor activity of specific T cell clones in patients with leukemia. *Klin Onkol*. 21(3):104-9.

Matsui, M. S. , Muizzuddin, N. , Arad, S., Marenus, K. (2003). Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 104 (1)13-22.

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

Padovan CS, Gerbitz A, Sostak P, Holler E, Ferrara JL, Bise K et al. Cerebral involvement in graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *Neurology* 2001; 56: 1106–1108.

Pasquini, M. C., Wang, Z., Horowitz, M. M. & Gale, R. P. (2010). 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin. Transpl.*, 87–105.

Piguet, P.F., Grau, G.E., Allet, B., Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease. *J experimental medicine* 166, 1280–1289.

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

Porter, D.L., Antin, J.H. (1999). The graft-vs.-leukemia effects of allogeneic cell therapy. *Annu Rev Med*. 50:369-86.

Ranganathan, P., Heaphy, C. E. A., Costinean, S., Stauffer, N., et al. (2012). Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155. *Blood*. 119:4786-4797.

Robb, R. J. & Hill, G. R. (2012). The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation. *Blood* 2012 : v119, 5351-5358.

Ryan, S., Gorman, D. M. and Nolan, Y. M (2011). Evidence that the Marine-derived Multi-mineral Aquamin has Anti-inflammatory Effects on Cortical Glial-enriched Cultures. *Phytother. Res.* 25: 765–767.

Saiz, A. & Graus, F. (2010). Neurologic Complications of Hematopoietic Cell Transplantation *Semin Neurol*; 30: 287-295.

Serody, J. S., Burkett, S. E., Panoskaltsis-Mortari, A., Ng-Cashin, J., McMahon, E., Matsushima, G. R., Lira, S. A., Cook, D. N., Blazar, B. R. (2000). T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 is critical to recruitment of CD8T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood*. 96, 2973- 2980.

Schroeder, M. A., DiPersio, J.F. (2011) Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech.* 4(3):318-33.

Shlomchik, W.D. (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 7(5):340-52.

Siegel D, Keller A, Xu W, Bhuta, S., Kim, D. H., Kuruvilla, J., Lipton, J. H., Messner, H., Gupta, V. (2007). Central nervous system complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, manifestations, and clinical significance. *Biol Blood Marrow Transplant.* ; 13:1369–1379.

Smith, P.D., Smythies, L.E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., Wahl, S.M. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 4:31–42.

Soares, C. M., Malagoli, B. G., Menezes, G. B., Pinho, V., Souza, D. G., Teixeira, M. M., Braga, F. C. (2012). Antiadhesive Activity of Polysaccharide-Rich Fractions from *Lithothamnion muelleri*. *Z. Naturforsch.* 67 c, 2012.

Stüber, E., Büschenfeld, A., von Freier, A., Arendt, T., Fölsch, U. R. (1999). Intestinal crypt cell apoptosis in murine acute graft versus host disease is mediated by tumour necrosis factor α and not by the FasL-Fas interaction: effect of pentoxifylline on the development of mucosal atrophy. *Gut.* 45:229–235.

Sullivan KM. Graft-vs.-host disease. In Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR (Eds.). (2004) *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation 2004*; Oxford, United Kingdom Blackwell Publishing Ltd pp. 635–664.

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

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

Thiele D.L., Eigenbrodt M.L., Bryde S.E., Eigenbrodt E.H., Lipsky P.E. Intestinal (1989) Graft-versus-Host Disease Is Initiated by Donor T Cells Distinct from Classic Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 84:1947-1956.

Tuncer, H. H., Rana, N., Milani, C., Darko, A., Al-Homsy, S. A. (2012) Gastrointestinal and hepatic complications of hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol.*18(16): 1851–1860.

Vairappan, C. S. (2003) Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomol Eng*,v.20 p.255–259.

Vairappan, C. S. (2004) Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry*, v.58, p.517–523.

Vodanovic-Jankovic S., Hari P., Jacobs P., Komorowski R. Drobyski W. R. (2006). NF-Kb as target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. *Blood*,107(2) 827-34.

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.

Westin, J.R., Saliba, R.M. , De Lima, M., Alousi, A., Hosing, C., Qazilbash, M. H., Khouri, I. F., Shpall, E. J., Anderlini, P., Rondon, G., Andersson, B.S., Champlin, R., Couriel, D. R. (2011). Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Advances in Hematology*, vol. 2011.

Will, A., Wynn, R. (2006). Diagnosis of acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 81, 505–506.

Wolf, D., von Lilienfeld-Toal, M., Wolf, A.M., Schleuning, M., von Bergwelt-Baildon, M., Held, S.A., Brossart, P. (2012). Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. *Blood.* 5;119(1):16-25.

Wysocki, C. A., Panoskalsis-Mortari, A., Blazar, B. R., Serody, J. S. (2005). Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 105, 4191– 4199.

Xia, G., R. L. Truitt, and B. D. Johnson. (2006). Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 12: 397–407.

Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z., Xu, Z.(2005) In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research*, v.50, p.47-53.