

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

**USO DE NANOCOMPOSTOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA
FARMACOLÓGICA NO CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
ASSOCIADA À DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO (GVHD)
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2012

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

**USO DE NANOCOMPOSTOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA
FARMACOLÓGICA NO CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
ASSOCIADA À DOENÇA DO ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO (GVHD)
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Priscila Teles de Tolêdo Bernardes

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

*“Só aqueles que têm a coragem de caminhar podem viver
todos os dias na certeza de chegar”.*

Eustáquio Messias Ricarte

Dedico este trabalho a Deus, fonte de vida.

Aos meus pais por serem um exemplo de determinação e humildade.

Ao Thiago por todo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, meu Pai criador, por ter me guiado em todos os momentos de minha vida.

À professora, Vanessa Pinho, pela acolhida, orientação e carinho. E principalmente, pelo exemplo de profissional que um dia desejo me tornar.

À Marina Castor, fonte de inspiração e conhecimento. Agradeço pelos conselhos, por sua generosidade, amizade e apoio.

Ao professor Mauro Teixeira pela oportunidade de fazer parte do grupo Imunofarmacologia.

Ao professor Mauricio Veloso Pinheiro pela colaboração e esclarecimentos.

À professora Danielle Souza pela alegria e disponibilidade com que me atendeu em todas as vezes que precisei de ajuda.

À professora Milene Rachid, pela cooperação e realização da análise histopatológica, neste estudo.

Aos amigos do grupo Imunofarmacologia, a Ilma e a todos do Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e Regeneração, pelos momentos memoráveis que passamos juntos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, a todos os professores, em especial à coordenadora, Denise Carmona, pela atenção e pelos ensinamentos recebidos e a Diana Àvila pelo atendimento sempre tão prestativo.

Aos colaboradores do CDTN, pela seriedade e atenção.

À Carolzinha, companheira de laboratório e experimentos.

Ao Thiago Àvila, Talles e Willian pela troca de idéias e colaboração na realização deste estudo.

À Vívian Vasconcelos, Zélia e professora Adaliene Versiani, por terem me acompanhado em meus primeiros passos dados no laboratório. Obrigada, pelo carinho de vocês.

Ao Fernando Lopes, por me apresentar ao laboratório e assim ter possibilitado que eu realizasse um grande sonho.

À Bárbara Maximino, minha grande amiga, pela ajuda imensurável e por tornar a minha caminhada mais leve.

Aos amigos Albená e Janaína Nunes pela atenção e generosidade.

À Alesandra pela presença amiga em todas as horas.

Às xuzinhas, Denise e Débora, pessoas maravilhosas, pelos ensinamentos e convivência sempre tão agradáveis.

Ao meu irmão Cláudio e minhas amadas avós pela torcida e orações.

Ao Thiago, meu grande companheiro, por fazer parte da minha vida. Obrigada, pela paciência, compreensão e, sobretudo pelo amor verdadeiro.

Aos meus amigos de ICB, EJC e a todos meus familiares pelos momentos de diversão e superação.

Em especial, aos meus amados pais, meus maiores exemplos. Obrigada por todas as vezes que abdicaram de seus sonhos para que pudesse realizar os meus. Com vocês aprendi o real significado da palavra amor, aprendi o que é bondade, humildade, respeito e principalmente aprendi o valor de uma família. Esta conquista é nossa.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras	09
Lista de Tabela	10
Lista de Abreviaturas	11
Resumo.....	13
Abstract	14
1. Introdução	15
2. Justificativa	24
3. Objetivos.....	25
4. Material e Métodos	26
4.1. Animais.....	26
4.2. Drogas e Reagentes	26
4.3. Indução da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda.....	26
4.4. Tratamentos utilizados.....	27
4.5. Avaliação dos parâmetros clínicos	29
4.6. Análise Histopatológica.....	30
4.7. Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD	31
4.8. Quantificação de citocinas e quimiocinas	33
4.9. Análise do acúmulo de macrófagos no tecido hepático	33
4.10. Análise do acúmulo de neutrófilos no tecido hepático.....	34
4.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na GVHD.	35
4.12. Translocação Bacteriana.....	35
4.13. Análise estatística	36
5. Resultados.....	37
5.1. Efeito do tratamento com fulerol na sobrevida e sinais clínicos da GVHD.....	37
5.2. Efeito do tratamento com fulerol sobre os parâmetros histopatológicos em órgão alvo da GVHD.	40
5.3. Efeito do tratamento com fulerol sobre os níveis de citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD.....	43
5.4. Acúmulo de leucócitos em órgão alvo da GVHD.....	45

5.5. Produção de espécies reativas de oxigênio.....	48
5.6. Efeito do tratamento da apocinina na GVHD.....	49
5.7. Efeito do fulerol na translocação bacteriana.....	52
6. Discussão	55
7. Conclusão.....	64
8. Perspectivas	65
9. Referências Bibliográficas	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – As três fases do modelo de GVHD aguda .	19
Figura 02 – Ilustração da forma tridimensional do fulereno C60.	21
Figura 03 – Indução da GVHD.	27
Figura 04 – Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado.	32
Figura 05 – O tratamento com o fulerol diminuiu a mortalidade da GVHD.	38
Figura 06 – O tratamento com o fulerol diminuiu a ocorrência dos sinais clínicos da GVHD.	39
Figura 07 – Efeito do tratamento do fulerol sobre a perda de peso em animais com GVHD.	40
Figura 08 – O tratamento com fulerol diminuiu o infiltrado inflamatório e o processo degenerativo no fígado de animais com GVHD.	41
Figura 09 – O tratamento com fulerol diminuiu o infiltrado inflamatório e o lesão no fígado de animais com GVHD.	42
Figura 10 – O tratamento com fulerol reduziu os níveis de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD.	43
Figura 11 – O tratamento com fulerol diminuiu o acúmulo de leucócitos no fígado de camundongos que desenvolveram GVHD.	46
Figura 12 – O tratamento com o fulerol diminuiu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), em órgãos alvos da GVHD.	48
Figura 13 – O tratamento com apocinina diminuiu a mortalidade da GVHD.	50
Figura 14 – Efeito do tratamento com apocinina sobre os sinais clínicos e peso de animais que desenvolveram GVHD.	51
Figura 15 – O tratamento com fulerol diminuiu a translocação bacteriana na cavidade abdominal, sangue e fígado de camundongos que desenvolveram GVHD.	52

LISTA DE TABELA

Tabela 01 – Escala clínica.....	30
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato

APC: célula apresentadora de antígeno

CAT: catalase

CFU: unidade formadora de colônia

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOX: doxorubicina

GSH: glutationa

GVHD: Graft-versus-host disease ou doença do enxerto versus hospedeiro

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

HLA : Antígenos de Histocompatibilidade Principal

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

i.v.: intravenosa

i.p.: intraperitoneal

IFN- γ : Interferon gama

LDH: desidrogenase de lactato

LPS: Lipopolissacarídeo

MDA: malondialdeído

MHC: Complexo de histocompatibilidade maior

MiHag(Minor histocompatibility antigen): antígenos de histocompatibilidade menor

MPO: mieloperoxidase

MRI (magnetic Resonance Imaging): imagem de ressonância magnética

NAG: n-acetilglicosaminidase

O₂⁻: ânion superóxido

OH⁻: radicais hidroxila

PDT: terapia fotodinâmica

TGI: trato gastrointestinal

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

ROS: reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

SOD: superóxido dismutase

TCH: transplante de células hematopoiéticas

RESUMO

A doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) é uma doença secundária ao transplante de células hematopoiéticas, sendo a maior limitação desta terapia e ocorre quando linfócitos do doador tornam-se ativados em resposta aos antígenos do hospedeiro causando danos a vários órgãos, dentre eles, o fígado, podendo levar à morte do paciente. A GVHD está associada à resposta inflamatória com liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Os fuleróis são nanocompostos com propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes com estrutura simétrica e estável e funciona como uma “esponja de radicais livres”. Baseado nestas propriedades, o presente estudo teve por objetivo verificar o efeito do fulerol no desenvolvimento da patogênese da GVHD. Para isto, utilizamos um modelo de transplante semi-alogênico, no qual esplenócitos de camundongos C57 foram transferidos para camundongos B6D2F1 (C57 x DBA) previamente irradiados. O tratamento com fulerol diminuiu a mortalidade, ocorrência e gravidade de sinais clínicos da GVHD. Esta proteção está ligada à redução dos níveis de ROS no fígado e baço de animais tratados com este nanocomposto. Corroborando este dado, observou-se nos camundongos tratados com fulerol uma diminuição no acúmulo de leucócitos, menor lesão histopatológica e menores níveis de IFN γ , TNF α , CCL2, CCL3, CCL5 no fígado após o vigésimo dia da doença. Além disto, a translocação bacteriana para o sangue, a cavidade peritoneal e o fígado de animais tratados com fulerol foi significativamente menor quando comparada aos animais com GVHD sem o tratamento. Para verificar se a atividade anti-oxidante poderia ser um mecanismo de proteção associada ao fulerol, utilizamos também, o tratamento com apocinina(3mg/Kg/dia). A apocinina induziu melhora dos sinais clínicos e aumento da sobrevivência dos camundongos com GVHD semelhante ao tratamento com fulerol, sugerindo que estratégias que atuem sobre ROS podem ser importantes no controle desta doença. Sendo assim, o fulerol pode ser uma estratégia promissora a ser utilizada 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. This elicits a cytokine cascade involving cytokine/chemokine production resulting in enhanced expression of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules on tissue antigen-presenting cells (APCs). Donor T cells subsequently become activated through recognition of host alloantigens and differentiate into effector T cells that recruit other cell types and lead to local inflammation and target tissue destruction. The recruitment of leukocytes to target organs is controlled by complex interaction between adhesion molecule, production of chemokine/cytokine and reactive oxygen species (ROS). Fullerols are nanocomposites with closed symmetry structure and anti-inflammatory and anti-oxidant properties that work as free radical scavengers. So, this study aimed to verify the effects of fullerol in a pathogenesis and development of GVHD using a model of adoptive transfer of splenocytes from C57BL/6J mice to B6D2F1 mice. The treatment with fullerol reduced mortality and severity of clinical signs of GVHD. This protection was associated with reduced production of ROS in liver and spleen. Further, the treatment with fullerol reduced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IFN γ , TNF α , CCL2, CCL3, CCL5), leukocytes accumulation in liver and provide lesser hepatic injury and bacterial translocation after twenty days of disease. Similarly, treatment with apocynin, which was given to WT transplanted mice, also resulted in reduced mortality and less weight loss and clinical scores. We suggest that strategies aimed at blocking the action of ROS may be useful in the treatment of GVHD. Then, in this study the fullerol was effective in reducing GVHD inflammatory response associated with GVHD in murines and could be relevant therapeutic strategies for this disease.

1) INTRODUÇÃO

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

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) tem emergido como um tratamento de escolha para várias doenças hematológicas, neoplásicas e congênitas tais como leucemia, anemia aplásica e falciforme, anemia de Blackfan-Diamond, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo, talassemias entre outras (Jaksch e Mattsson, 2005; Ferrara e cols., 2009). O TCH consiste na transferência de células hematopoiéticas para um receptor imunossuprimido. Estas células têm a capacidade de renovação contínua e de gerar progenitoras para as células maduras que constituem o sangue e o sistema imune (Martelli e cols., 2003). A imunossupressão do receptor (regime de condicionamento) é realizada através de radioterapia ou quimioterapia e drogas imunossupressoras, ocorre antes do transplante e é importante para eliminar células doentes (Mapara e cols., 2006). O transplante pode ser autólogo, no qual o doador é o próprio paciente, alogênico, no qual o doador é alguém compatível geneticamente (sistema HLA-antígenos de histocompatibilidade principal) com o paciente, podendo ser um parente ou alguém não relacionado, ou ainda singênico que ocorre entre irmãos gêmeos. Somente 25 a 30% dos pacientes têm na família um doador para o TCH alogênico que seja compatível geneticamente (Choi e cols., 2010). Mais de vinte e cinco mil transplantes alogênicos de células hematopoiéticas são realizados anualmente em todo o mundo (Choi e cols., 2010; Ferrara e cols.; 2009). Contudo, o acesso a esta forma de terapia tem sido limitado à disponibilidade de doadores HLA compatíveis e à doença do enxerto versus hospedeiro (graft versus host disease – GVHD) (Ferrara e cols., 2009). A GVHD é a principal complicação do TCH alogênico. Cerca de 35% a 50% dos pacientes que passaram por um TCH

desenvolveram GVHD aguda e 15% a 40% destes morreram devido à doença (Ferrara e cols., 2009).

A GVHD é uma doença sistêmica que evolui rapidamente e consiste em uma reação das células imunes doadas contra o tecido do hospedeiro (receptor) e é caracterizada por imunossupressão e lesão tecidual em vários órgãos como intestino, pele, fígado e pulmão (Jacobsohn, 2002; Ferrara e cols., 2005, 2006, 2009; Castor, 2010, 2011). Esta doença ocorre quando os linfócitos T contidos no transplante reconhecem disparidades antigênicas entre o doador e o receptor (Ball e Egeler, 2008). Ela pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. Geralmente, a GVHD crônica inicia-se após, aproximadamente, cem dias do transplante e é semelhante a uma doença auto-imune (Will e Wynn, 2006). Na GVHD aguda, as manifestações da doença ocorrem em um período de duas a seis semanas após o transplante e são decorrentes das lesões dos órgãos alvo envolvendo diarreia, vômitos, erupções cutâneas e disfunção hepática (Will e Wynn, 2006, Ferrara e cols., 2007, 2009).

A etiologia da GVHD é bastante complexa. Sua prevalência varia de acordo com o grau de histocompatibilidade entre receptor e doador (diferença entre os antígenos de histocompatibilidade principal e menor – HLA e miHag), a idade (aproximadamente 20% dos indivíduos com até vinte anos, que são submetidos ao TCH desenvolvem GVHD aguda enquanto que indivíduos com mais de cinquenta anos de idade têm 80% de chance de desenvolvê-la) e o sexo (devido às diferenças entre o complexo de histocompatibilidade menor entre mulher e homem) (Ferrara e cols., 2005, 2007). A fonte das células e o regime de condicionamento também podem favorecer a ocorrência da GVHD (Ferrara e cols., 2005). Células do cordão umbilical estão menos associadas à GVHD do que células de outra região. Uma explicação para este fato é que estas células ainda estão imaturas e, portanto, menos funcionais (Ferrara e cols., 2005). Quanto ao regime de condicionamento, vários estudos têm

mostrado que a destruição do tecido e a consequente liberação de citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da GVHD (Jaksch e Mattsson, 2005; Mapara e cols, 2006; Choi e cols, 2010; Kittan e Hildelbrandt, 2010). O condicionamento leva a uma imunossupressão do receptor, a fim de diminuir a rejeição do enxerto e é realizado através de irradiação e/ou drogas imunossupressoras (Serody e cols., 2000; Mapara e cols., 2006). Nos modelos animais a irradiação é utilizada para mimetizar o regime de condicionamento realizado em seres humanos.

Três fases são descritas na GVHD aguda (figura1). A primeira fase é provocada pelo regime de condicionamento que afeta o sistema imune do hospedeiro e também provoca lesão de outros tecidos ocasionando nestes uma produção exacerbada de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Serody e cols., 2000; Jaksch e Mattsson, 2005, Ferrara e cols, 2007, 2009). Ocorre também, um aumento na expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e moléculas co-estimulatórias pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Jaksch e Mattsson, 2005). Danos ao trato gastrointestinal (TGI) resultado do regime de condicionamento são particularmente importante neste processo, pois permitem a translocação sistêmica de bactérias e produtos microbianos como lipopolissacarídeo (LPS) que aumentam ainda mais a ativação de APCs (Hill e cols., 1997; Cooke e cols., 2001; Murai e cols., 2003). A segunda fase ocorre após o transplante, ocasião em que as células T doadas interagem com as APCs do hospedeiro levando a ativação e a diferenciação de células T em células T citotóxicas efetoras. Essas migram para os tecidos dos órgãos que foram anteriormente lesados pelo condicionamento, chamados neste contexto de órgãos alvo (intestino, fígado, pulmões e pele) (Jaksch e Mattsson, 2005). Finalmente, a fase efetora consiste na destruição destes órgãos pelas células T que além de desempenharem sua função citotóxica, liberam mediadores inflamatórios

ativando células residentes e recrutando células inflamatórias, como os macrófagos (Serody e cols., 2000; Wysocki e cols., 2005). A ativação de macrófagos está relacionada a uma explosão oxidativa que pode levar ao aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são importantes mediadores da lesão tecidual. O dano celular é mediado pelos radicais livres e oxidantes produzidos por células ativadas (Ferrara e Deeg, 1991; Krenger e cols., 1997; Ferrara e cols., 2006). A formação de radicais livres é um passo essencial para a indução da migração de leucócitos para o tecido lesado, além de contribuir fortemente para a amplificação de respostas inflamatórias (Goldin e Kesari, 1986).

Desde a década de 70, modelos animais vêm sendo utilizados como uma estratégia de estudo da GVHD, visando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória associada à doença (Howard e Woodruff, 1961). A primeira descrição da GVHD aguda foi realizada por cientistas envolvidos em transplantes experimentais de células alogênicas do baço em camundongos previamente irradiados (Will e Wynn, 2006). Um dos modelos animais propostos para o estudo da GVHD consiste no transplante de esplenócitos do camundongo C57BL/6 para o B6D2F1 (que é o cruzamento da linhagem de camundongo C57BL/6 com o DBA/2) (El-Hayek e cols., 2005; Vodanovic e cols., 2006; Castor e cols., 2010, 2011) e este foi o modelo de escolha utilizado para o presente estudo.

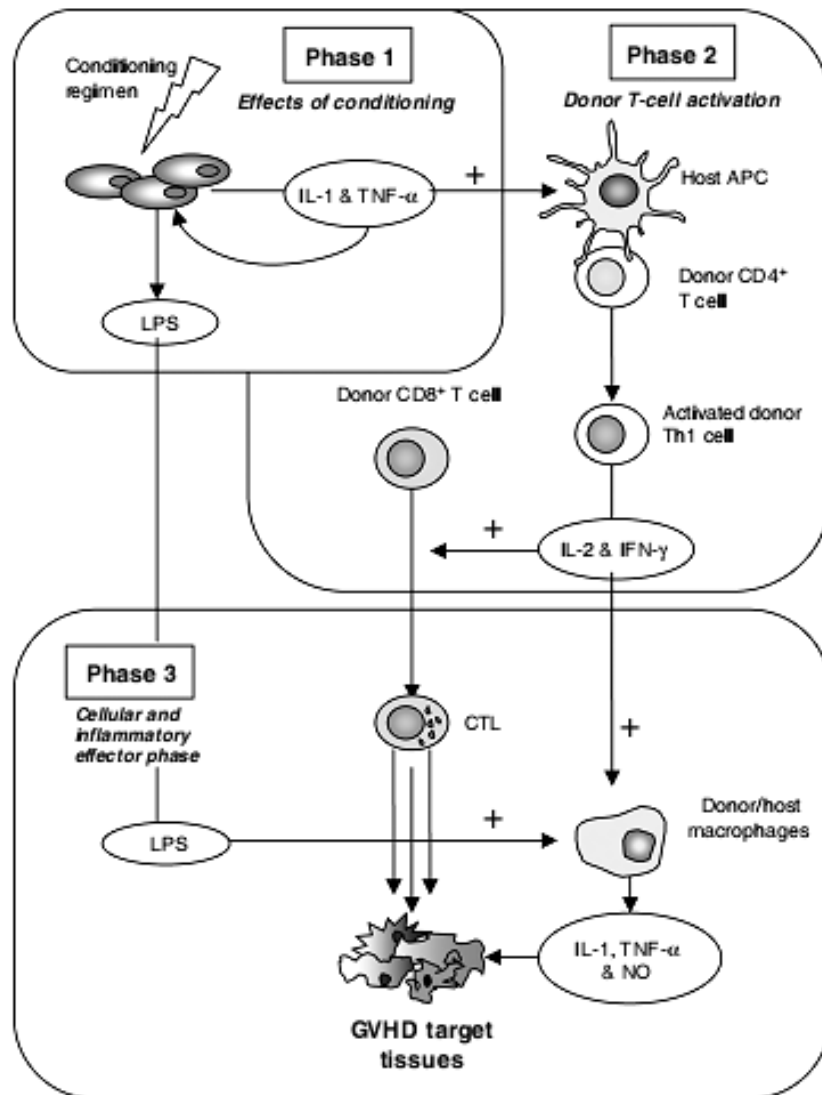


Figura 1 - As três fases do modelo de GVHD aguda. A fase 1 desencadeada pelo regime de condicionamento. A fase 2 onde ocorre a ativação da célula T, a partir da sua interação com a APC e a fase 3 onde a célula T migra para os órgãos alvo e junto aos macrófagos empreendem uma resposta efetora nestes tecido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

Espécies reativas de oxigênio

Consideram-se como espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) todas aquelas moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com uma alta capacidade oxidativa (Kohen e Nyska, 2002). As principais ROS distribuem-se em dois

grupos: os radicalares como hidroxila ($\text{OH}\cdot$), radical superóxido (O^-), e os não-radicalares, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e são produzidas ao longo de toda a cadeia respiratória.

Durante o metabolismo aeróbico aproximadamente 95% do oxigênio (O_2) consumido decorre da produção de energia nas mitocôndrias celulares, sendo que o restante é reduzido à água (Urso e Clarkson, 2003). A formação da água consiste na redução do O_2 e adição de íons de hidrogênio. Durante esse processo, são formados intermediários reativos, as espécies reativas de oxigênio (radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila).

O papel principal de ROS é funcionar como parte da defesa do organismo contra a agressão de microrganismos sob controle de estímulos e sinais moleculares. Entretanto, quando ROS são geradas em excesso pela ativação aumentada de fagócitos ou por níveis diminuídos das defesas antioxidantes, por exemplo, provocam estresse oxidativo que está associado a várias desordens patológicas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurodegenerativas, isquemia e reperfusão hepática, Diabetes Mellitus, entre outras (Rodhen e cols., 2000; Dugan e cols., 2001; Calles, e cols., 2001; Monlavi e cols., 2004; Reuter e cols., 2010). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na qual existe alteração do estado redox celular e aumento da susceptibilidade ao dano oxidativo nas diversas estruturas celulares (Davis e cols., 2006). O aumento de ROS está entre um dos potenciais mecanismos que medeiam danos a órgãos, tais como pulmão e fígado após transplante de células hematopoiéticas (Patel e cols., 1984; Weijl e cols., 1997). Amer e colaboradores (2007) demonstraram que na GVHD células sanguíneas como hemácias, neutrófilos e linfócitos estão sob condições de estresse oxidativo resultado de uma produção aumentada de ROS e que o tratamento com antioxidantes que reduzem esta condição, pode ser útil no controle da resposta inflamatória associada a esta doença. Embora

existam esses dados eles não demonstram os mecanismos de ação de ROS na GVHD e nem sua importância para proteção do desenvolvimento da doença.

Fulerenos

Em 1985, Kroto e colaboradores relataram a descoberta de um composto molecular estável e simétrico, constituído exclusivamente por átomos de carbono que receberam o nome de fulerenos. Os fulerenos são uma vasta família de nanomoléculas superaromáticas, altamente simétricas com estrutura esférica, formada por hexágonos interligados por pentágonos, sendo estes últimos responsáveis pela curvatura da molécula e, conseqüentemente, por sua forma tridimensional (Kroto e cols., 1985).

Dentre os fulerenos, a molécula C₆₀ é a mais abundante e representativa. O C₆₀ é formado por 20 hexágonos e 12 pentágonos, com 30 ligações carbono-carbono situadas nos vértices das fusões entre pentágonos e hexágonos e possuem um diâmetro de aproximadamente 1nm.

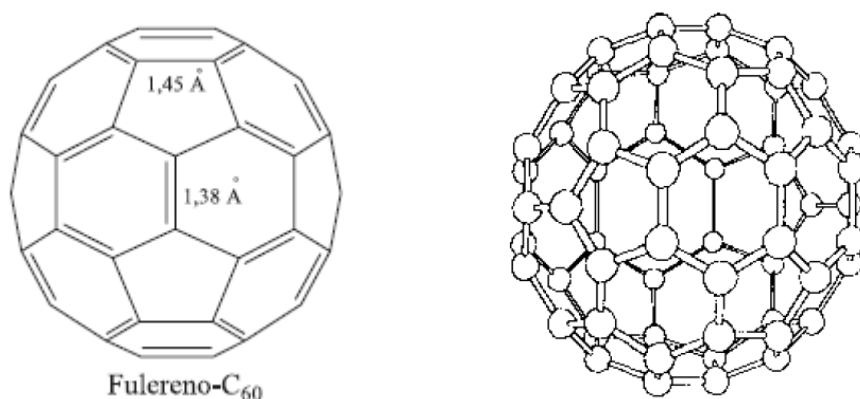


Figura 2. Ilustração da forma tridimensional do fulereo C₆₀, molécula mais abundante e representativa dentre a família dos fulerenos.

Devido à sua forma tridimensional, suas ligações insaturadas e sua estrutura eletrônica, os fulerenos apresentam propriedades físicas e químicas únicas que podem ser exploradas em várias áreas da bioquímica e da medicina (Da Ros e Prato, 1999; Bosi e cols., 2003). Dentre a vasta gama de aplicações biomédicas dos fulerenos, destacamos:

1-Transporte de drogas de efeito radioterápico e contrastes para diagnóstico por imagem (*Magnetic Resonance Imaging* - MRI e tomografia por raios-X) (Cagle e cols., 1996, 1999; Thrash e cols., 1999; Sueki e cols., 2003).

2-Terapia fotodinâmica (PDT) através da produção de oxigênio singleto e outros radicais livres. (Kamat e cols., 1998, 2000; Yamakoshi e cols., 2003; Vileno e cols., 2004);

3-Foto-clivagem do DNA (Tokuyama e cols., 1993; Higashi e cols., 1997);

4-Atividade anti-viral, através da inibição do acesso de enzimas virais ao substrato pelo preenchimento da cavidade hidrofóbica dos sítios catalíticos (Zhu e cols., 2003);

5-Atividade anti-microbiana por intercalação e desestruturação de membranas celulares (Da Ros e cols., 1996; Mashino e cols., 1999);

6-Atividade anti-oxidante e de armadilhas de radicais livres (Lai e cols., 1997 ; Chiang e cols., 1995 ; Da Ros e Prato, 1999 ; Tsai e cols., 1997);

7. Atividade anti-inflamatória (Yudoh e cols., 2009)

Um dos inconvenientes para as aplicações de fulerenos em biomedicina é a sua baixa solubilidade em água. A hidrossolubilidade dos fulerenos com o desenvolvimento dos fuleróis foi um marco para a pesquisa e o desenvolvimento de aplicações biomédicas destas moléculas. Os fuleróis são derivados do C60, formados a partir da adição de grupos polares (OH) (Alves e cols., 2006).

O potencial anti-oxidante dos fuleróis tem sido utilizado como uma estratégia eficiente no controle da resposta inflamatória em doenças associadas ao dano causado por

estresse oxidativo, tais como doenças neurodegenerativas e complicações hepáticas, em estudos animais (Dugan e cols., 2001; Injac e cols., 2008; Quick et cols., 2008).

A propriedade anti-inflamatória do fuleróis foi descrita por Yudoh e colaboradores (2009), em um modelo de artrite reumatóide em ratos. O tratamento com o fulerol ao diminuir níveis de citocinas inflamatórias, reduziu a destruição articular e sinovial nos animais.

No presente estudo nos concentraremos na investigação das propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias dos fulerenos e de seus derivados hidrossolúveis, os fuleróis.

2) JUSTIFICATIVA

Uma vez que a GVHD é uma doença sistêmica caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada, com aumento da liberação de mediadores inflamatórios e aumento de espécies reativas de oxigênio nas células sanguíneas e visto que o fulerol possui propriedade anti-oxidante e anti-inflamatória, torna-se de grande interesse o estudo desse nanocomposto no controle da resposta inflamatória associada à doença do enxerto versus hospedeiro em camundongos.

3) OBJETIVOS

Este estudo teve como **objetivo geral** avaliar o efeito do nanocomposto fullerol na resposta inflamatória associada à doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) em camundongos. E como objetivos específicos:

3.1. Avaliar o efeito do tratamento com o fullerol no desenvolvimento da GVHD aguda em camundongos. Os parâmetros avaliados foram:

I. sobrevida dos animais;

II. evolução dos aspectos clínicos e histopatológicos da doença;

III. acúmulo de células inflamatórias por meio da medição da atividade de enzimas específicas macrófagos (n-acetilglicosaminidase, NAG) e neutrófilos (mieloperoxidase, MPO)

IV. níveis das citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD, através da dosagem das mesmas utilizando-se a técnica de ELISA no fígado dos animais;

3.2. Avaliar o efeito do fullerol sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em órgãos alvo da GVHD (baço e fígado) através da dosagem de ROS por quimioluminescência.

3.3. Avaliar o efeito antioxidante na sobrevida e sinais clínicos da GVHD aguda em camundongos através do tratamento com apocinina.

3.4. Avaliar o efeito do fullerol na translocação bacteriana no fígado, sangue e cavidade peritoneal na GVHD.

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: 209/2011.

4.2) Drogas utilizadas

O fulerol (C₆₀(OH)₁₈₋₂₀) foi obtido em parceria com o professor Maurício Veloso Brant Pinheiro Departamento de Física da Universidade federal de Minas Gerais. A apocinina foi adquirida da Sigma (St Louis, MO, U.S.A).

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

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 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. 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 ressuspenso 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, 2011).

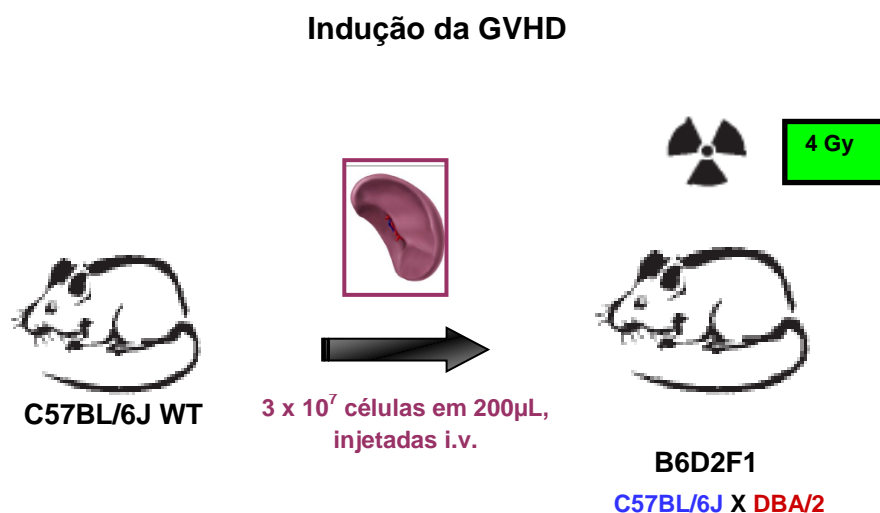


Figura 3 – Indução da GVHD: dois dias após a irradiação, os camundongos B6D2F1 sofreram transplante de células do baço oriundas dos doadores parentais, C57BL/6JWT. O transplante entre camundongos B6D2F1 para B6D2F1 não resulta em GVHD e é definido como grupo controle.

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 em 02 grupos

denominados: fulerol e GVHD. No grupo fulerol, os animais foram tratados com o nanocomposto fulerol (10mg/Kg) dissolvido em PBS autoclavado. No grupo denominado GVHD, os camundongos receberam injeção de PBS autoclavado. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p) (100 μ L/ animal) 30 minutos antes do transplante e, após o transplante, 48 em 48 horas até o final do experimento. Animais do grupo controle não receberam nenhum tipo de tratamento.

No experimento com apocinina, os camundongos B6D2F1 que receberam esplenócitos de C57BL/6J (C57BL/6J para B6D2F1) foram divididos em dois grupos denominados: GVHD e Apocinina (animais tratados com 3mg/Kg de apocinina). Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (100 μ L/animal) 30 minutos antes do transplante e, após o transplante, 24 em 24 horas até o final do experimento. A apocinina foi dissolvida em PBS autoclavado e 5% de etanol. Animais do grupo GVHD receberam injeção intraperitoneal de PBS e 5% de etanol. Animais do grupo controle não receberam nenhum tipo de tratamento.

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 (Colson e cols., 2004; Cooke e cols., 2001, Castor e cols., 2010, 2011) 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 quite diagnóstico da FECA-CULT™, de acordo com as instruções do fabricante. Estes sete parâmetros foram pontuados de zero a dois, somando um total de 14 pontos. O aspecto do pêlo (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 (pouco sangue) e 2,0 (muito 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 aparentel/ 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: pouco sangue/ 2,0: muito sangue
Diarréia	0: ausência / 1,0: pastosa / 2,0: líquida
Total	14 pontos

Tabela 1 – Escala clínica. Adaptada a partir de dados da literatura (Colson e cols., 2004; Cooke e cols., 2001, Castor e cols., 2010, 2011) para a verificação dos parâmetros clínicos ocasionados pela reação inflamatória gerada pela GVHD.

4.6) Análise Histopatológica

- Confeção de lâminas histológicas

Porções do fígado foram retiradas dos camundongos dos grupos estudados nos períodos dez e vinte dias após o transplante. Estas porções foram armazenadas 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), Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá sintético.

4.7) Quantificação dos parâmetros histopatológicos da reação inflamatória ocasionada pela GVHD.

As lâminas histopatológicas do fígado foram analisadas ao microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando-se objetivas de 4x e 10x. 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 (Castor e cols, 2010). Atribuiu-se um valor numérico às alterações degenerativas observadas no **parênquima** de acordo com os critérios abaixo:

0 = normal;

1= discreto vacuolização citoplasmática e eosinofilia focal;

2 = difusa vacuolização, alteração da forma do hepatócito, alterações nucleares acentuadas;

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

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

0 = nenhum ou raro;

1 = discreto infiltrado na área periportal;

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

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

Cada camundongo recebeu uma graduação gerada pela soma dos 2 critérios acima que poderia chegar a um índice máximo de 6 pontos (figura 4).

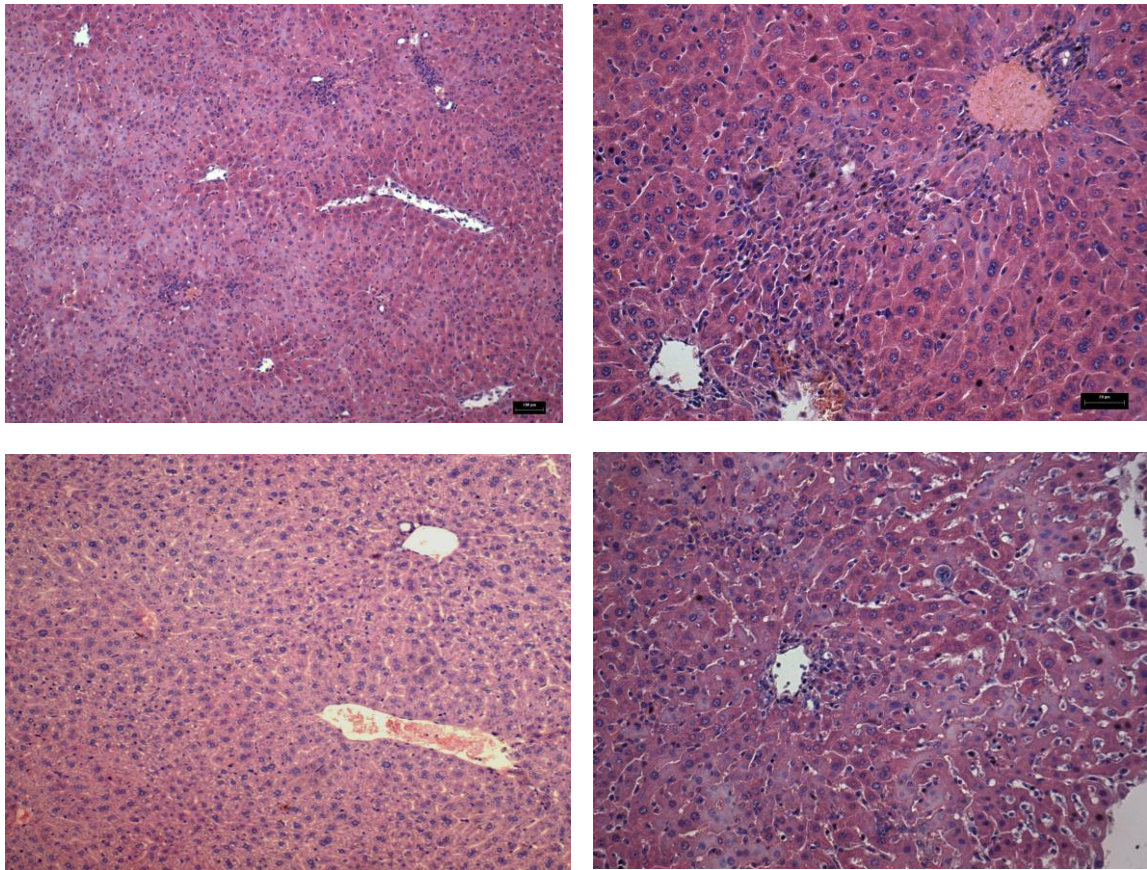


Figura 4 – Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado. À esquerda em cima uma foto de um fígado avaliado com graduação mínima. À direita, em cima, presença de congestão vascular com infiltrado acentuado nos vasos da área periportal e veia centro lobular que invade o parênquima hepático. À esquerda em

baixo um fígado com sinais necrose hepatocitária alteração da forma do hepatócito e alargamento dos sinusóides.

4.8) Quantificação de citocinas e quimiocinas

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

4.9) Análise do acúmulo de macrófagos no tecido hepático

Para avaliar o acúmulo de macrófagos em órgãos alvos da GVHD, foi utilizado o método de quantificação da atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Uma porção de 100 mg do 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 1:3.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) na

concentração final de 2,24mM. A reação se processou a 37°C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em leitor de E.L.I.S.A. (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3% (dados não mostrados). Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido úmido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de macrófagos”/100mg de tecido.

4.10) Análise do neutrófilos no tecido hepático

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 tecido foi ressuspensa em solução de Buffer I (1,9ml/100mg) 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 tetramethylbenzine (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.

4.11) Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na GVHD

A produção de ROS foi analisada por quimioluminescência, 20 dias após o transplante, no fígado e baço de animais dos grupos controle, veículo e fulerol e foram mensuradas com auxílio da sonda 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), que é permeável à membrana celular e não-fluorescente. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF), que permanece intracelular (SRIVASTAVA e cols., 2009).

A capacidade para gerar ROS foi avaliada utilizando a sonda dihidrorodamina 123 (DHR-123). A DHR-123 é uma substância que se acumula na célula e é oxidada, na presença de ROS, dando origem à rodamina 123 (R-123), que é uma substância fluorescente (SRIVASTAVA e cols., 2009). O homogenato foi cultivado em placas de 96 poços. As culturas foram mantidas durante 2 h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, estes foram incubados, com as sondas DCF-DA (20 µM), DAF-2DA (10 µM) e DHR-123 (5 µM), por 30 minutos, em estufa a 30°C. Esta etapa do experimento foi realizada ao abrigo da luz, pois os marcadores são fotossensíveis. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência (Synergy 2, BIOTEK) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 530 nm, respectivamente.

4.12) 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 μ L do líquido recolhido foram espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura Muller Hilton. 100 μ L de sangue e 100mg de fígado triturado em 1ml de PBS autoclavado também foram coletados e 100 μ L da amostra foram espalhados uniformemente em uma placa de petri de vidro contendo meio de cultura. O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 horas de armazenamento da placa em estufa a 37° contando o número de CFU (unidade formadora de colônia).

4.1) Análise estatística

Resultados no texto são mostrados como média e erro padrão da média (\pm SEM). Comparação entre grupos foi realizada através do teste estatístico ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5) RESULTADOS

5.1) Efeito do tratamento com fulerol na sobrevivência e sinais clínicos da GVHD

Após a indução da GVHD, analisou-se a sobrevivência dos animais e os sinais clínicos da GVHD durante todo o experimento. O grupo controle (B6D2F1 → B6D2F1) não desenvolveu GVHD e apresentou 100% de sobrevivência até o final do experimento. Em contraste, camundongos do grupo GVHD tratado apenas com PBS morreram em até vinte e seis dias após o transplante. O grupo tratado com fulerol apresentou uma taxa de 80% de sobrevivência (figura 5). É importante ressaltar que mesmo após cessar o tratamento com o fulerol (encerrou-se o tratamento trinta dias após o transplante), a taxa de sobrevivência continuou sendo a mesma neste grupo (este experimento foi encerrado cinquenta dias após a indução da doença). Além de diminuir significativamente a letalidade, observou-se que, a graduação clínica da doença a partir do décimo dia do transplante, foi significativamente diminuída quando camundongos eram tratados com o fulerol (Figura 6 A-B). Não houve diferença significativa entre o grupo fulerol e o grupo GVHD, quando analisado a variação de perda de peso, entretanto observou-se que animais tratados com fulerol começaram a recuperar o peso vinte dias após o transplante, aproximadamente (Figura 7).

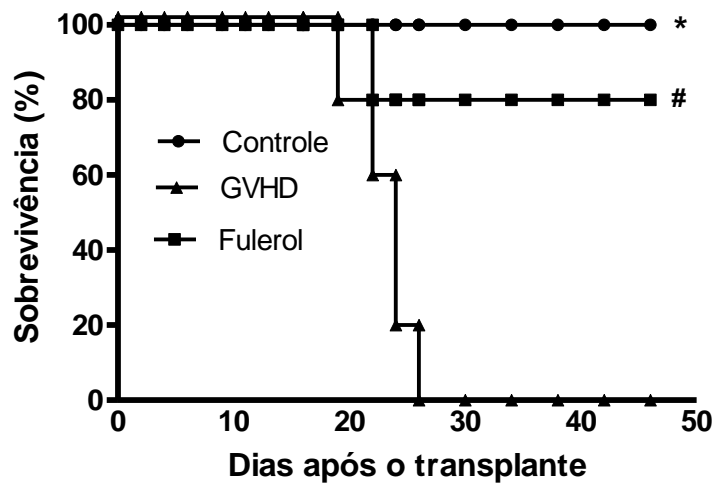
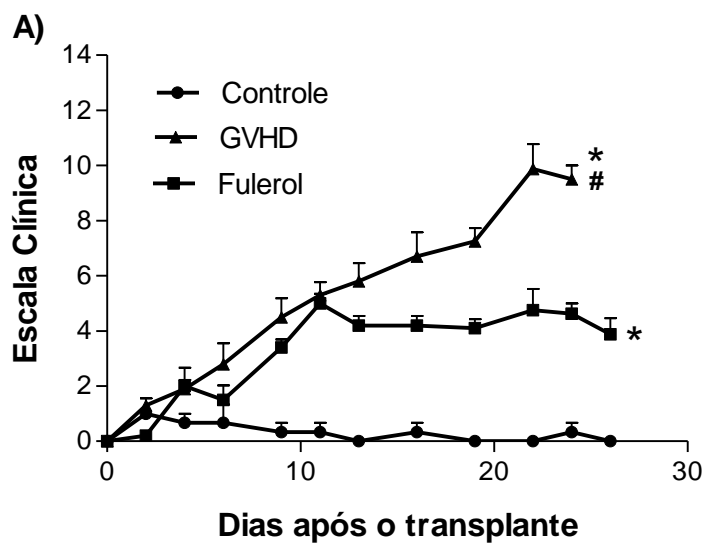


Figura 5 – O tratamento com o fulerol diminuiu a mortalidade da GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do trasplante até o 30º dia após a indução da doença. O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para controle da mortalidade. *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD, n=5.



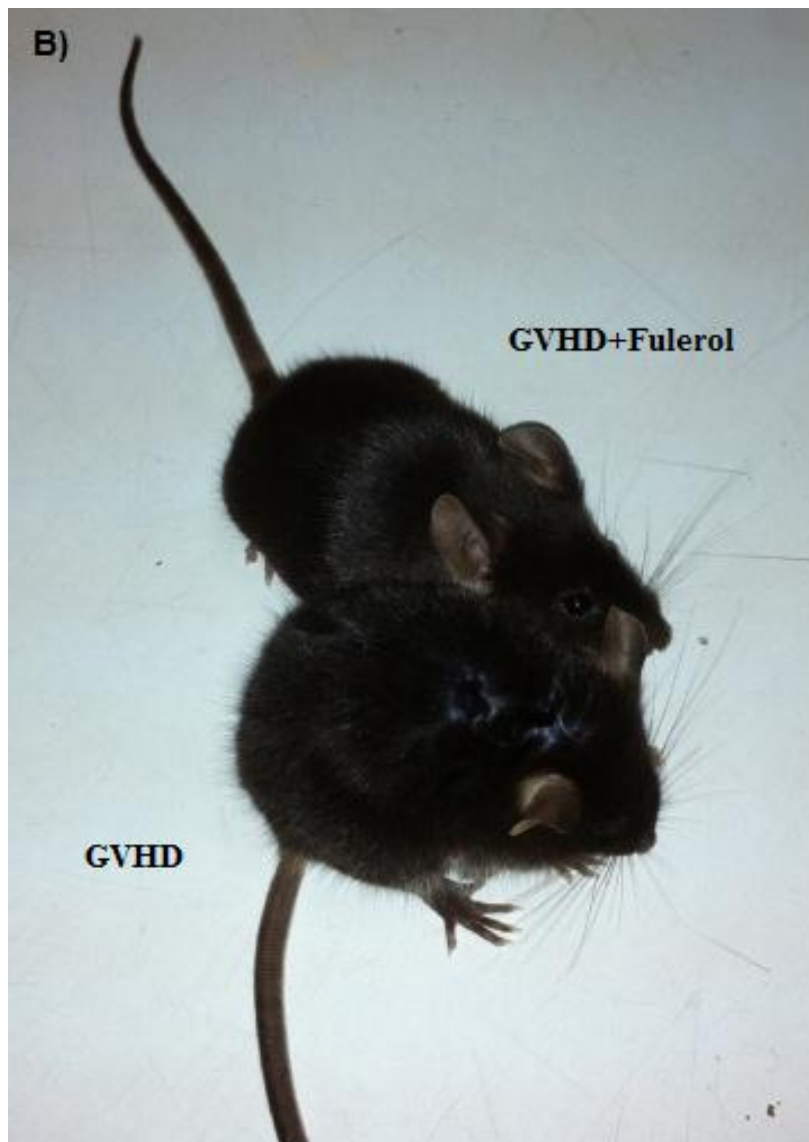


Figura 6 – O tratamento com o fulerol diminuiu a ocorrência dos sinais clínicos da GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do trasplante até o 30º dia após a indução da doença. O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para controle da graduação clínica (A). Fotografia de animais que desenvolveram GVHD tratados ou não com fulerol vinte dias após a indução da doença. Em cima, um animal do grupo GVHD tratado

com fulerol. Embaixo, um animal que desenvolveu GVHD não tratado. (B). *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD, n=5.

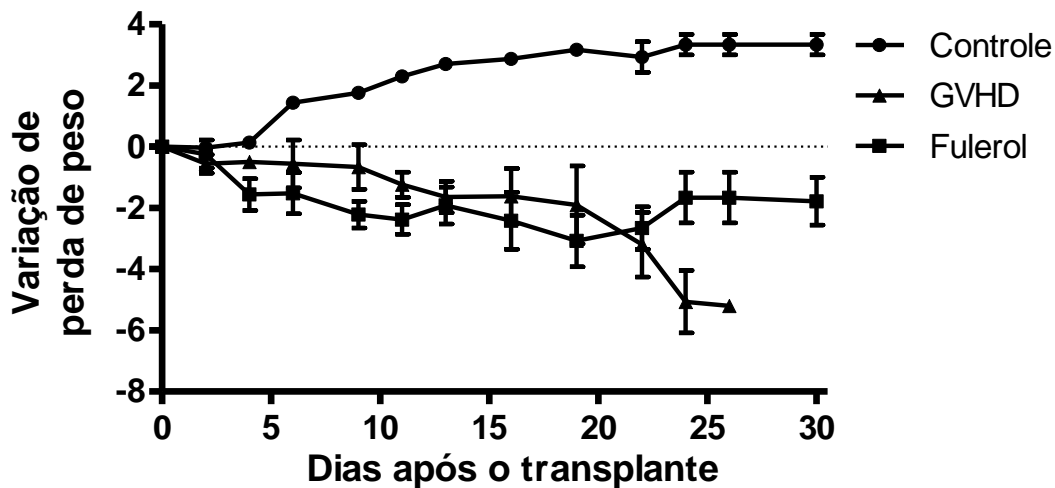


Figura 7 – Efeito do tratamento do fulerol sobre a perda de peso em animais com GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do trasplante até o 30º dia após a indução da doença. O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para mensuração do peso corporal. Grupos n=5.

5.2) Efeito do tratamento com fulerol sobre os parâmetros histopatológicos em órgão alvo da GVHD

Com a finalidade de verificar como o fulerol poderia interferir na evolução da GVHD induzida em camundongos, secções do fígado (órgão alvo da doença) foram processadas dez e vinte dias após o transplante, que correspondem ao início dos sinais clínicos e início da

mortalidade, respectivamente, para verificação dos parâmetros histopatológicos da doença. O grupo controle não apresentou alterações histopatológicas, em nenhum período analisado. Os grupos GVHD e fulerol apresentaram uma infiltração de células inflamatórias e alguns sinais degenerativos dez dias após o transplante (figura 8). Entretanto, no vigésimo dia, observamos uma menor graduação histopatológica da doença, com menor infiltrado inflamatório e diminuição significativa do processo degenerativo no grupo tratado com o fulerol quando comparado ao grupo GVHD tratado com PBS. (Figura 8 A e 9 A-B).

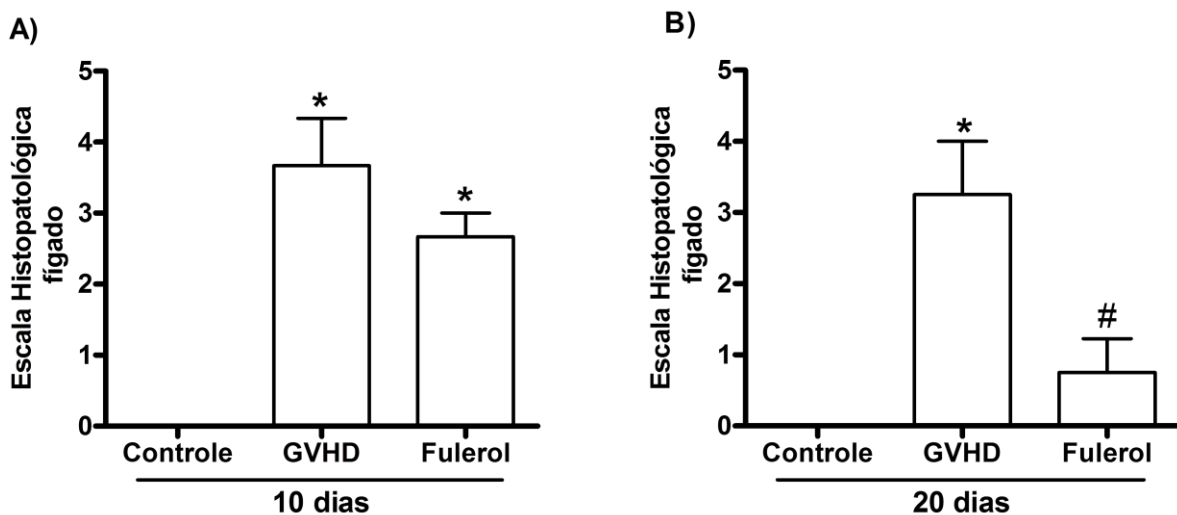


Figura 8 – O tratamento com fulerol diminuiu o infiltrado inflamatório e a lesão no fígado de animais com GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Camundongos foram sacrificados 10 e 20 dias após o transplante, e o fígado foi retirado para análise histopatológica. Graduação histopatológica 10 dias (A) 20 dias pós-transplante (B). Resultados são apresentados como média \pm SEM (n=5). *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD.

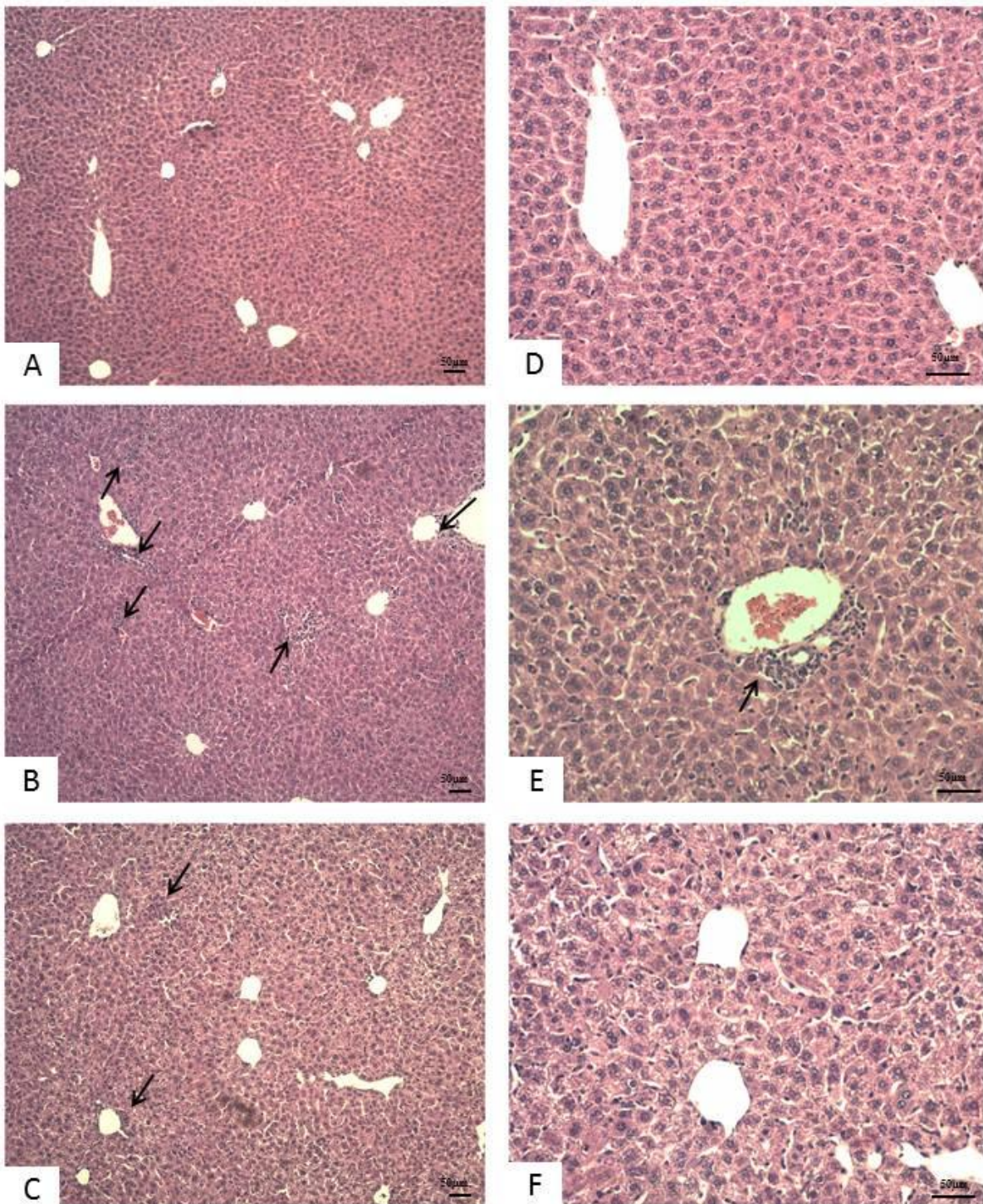
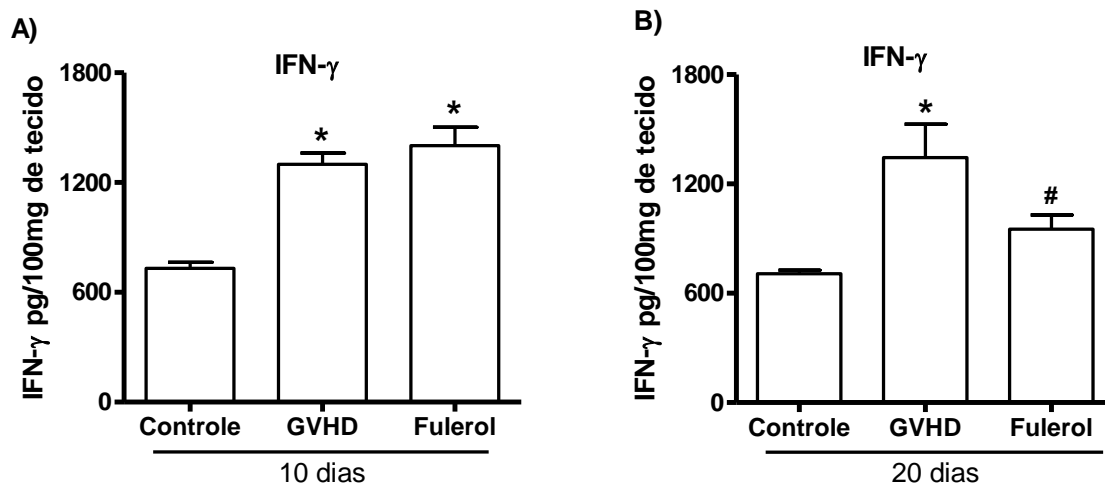


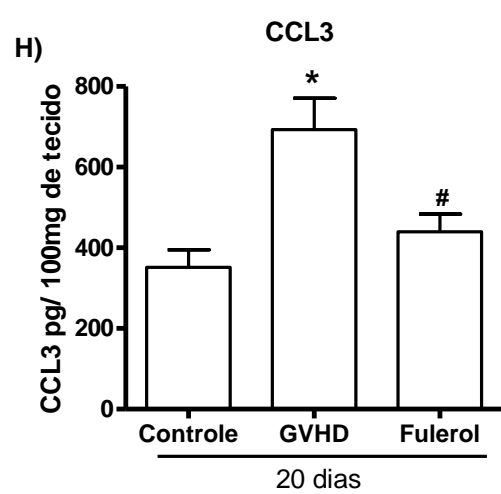
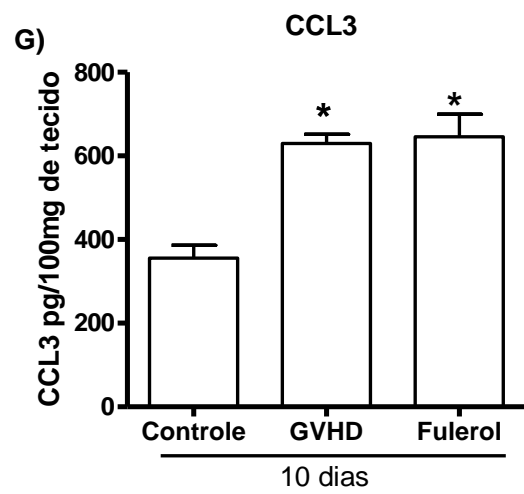
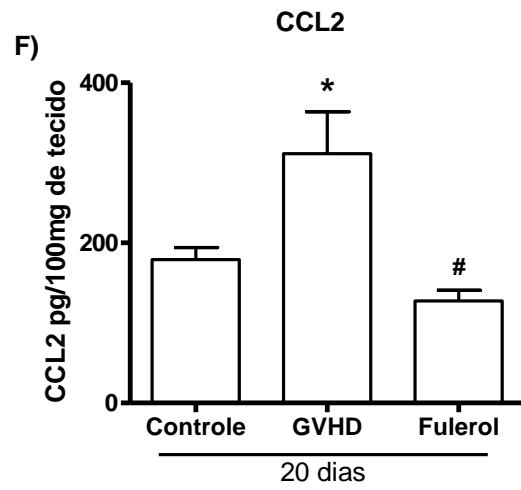
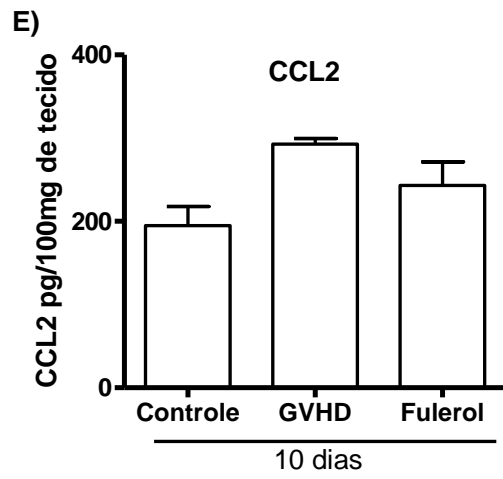
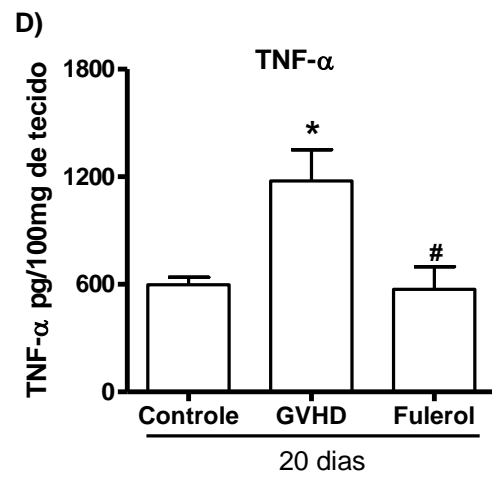
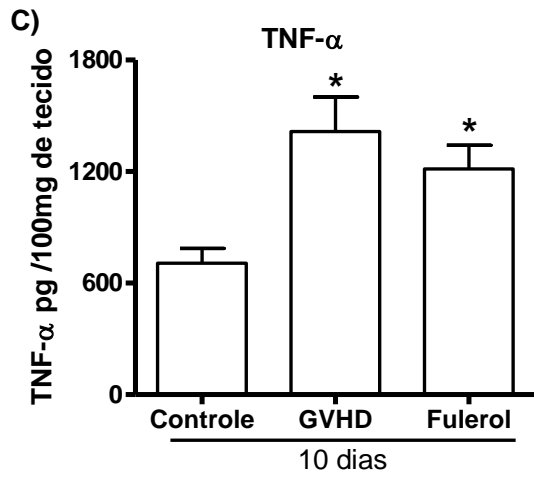
Figura 9 – O tratamento com fulerol diminuiu o infiltrado inflamatório e a lesão no fígado de animais com GVHD. Representação histológica do fígado vinte dias após a indução da doença. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal

(i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Camundongos foram sacrificados 20 dias após o transplante e o fígado foi retirado para análise histopatológica. Aspecto histológico do fígado de camundongos do grupo controle (A), do grupo GVHD (B) e do grupo fulerol, 20 dias após a indução da GVHD (C) Aumento: 4x. Grupo controle (D), grupo GVHD (E) e grupo fulerol, 20 dias após a indução da GVHD (F) Aumento: 10x. Escala = 50 μ m.

5.3) Efeito do tratamento com fulerol sobre os níveis de citocinas e quimiocinas envolvidas na GVHD

Uma porção do fígado foi retirada dos animais tratados e não tratados com o fulerol, dez e vinte dias após o transplante, para análise das citocinas: IFN γ e TNF α e quimiocinas: CCL2, CCL3 e CCL5. Não houve diferença significativa entre os grupos GVHD tratados e não tratados com o fulerol, no décimo dia após o transplante. Entretanto, coincidentemente à diminuição da lesão no fígado, conforme figura 9, os níveis das citocinas e quimiocinas analisadas, foram significativamente menores vinte dias após o transplante, quando animais que desenvolveram GVHD foram tratados com o fulerol (figura 10 A-J).





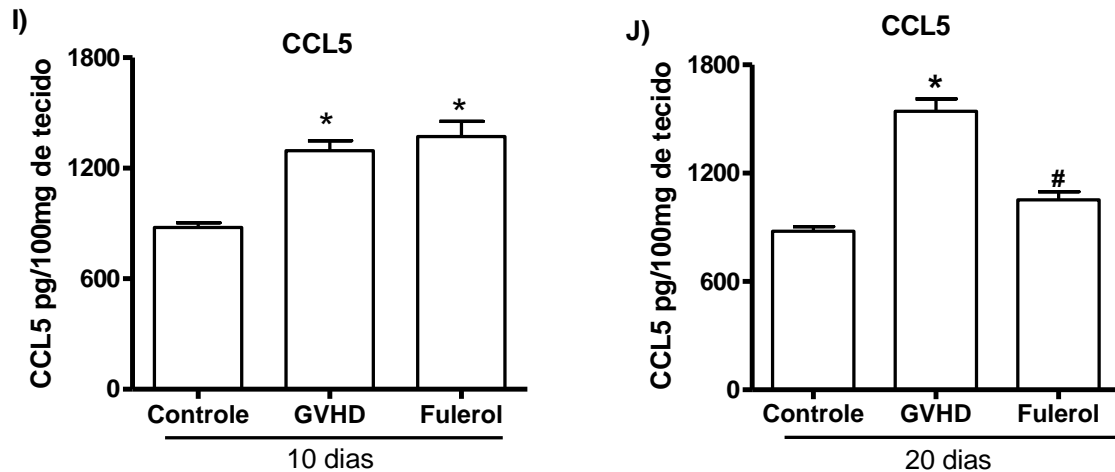
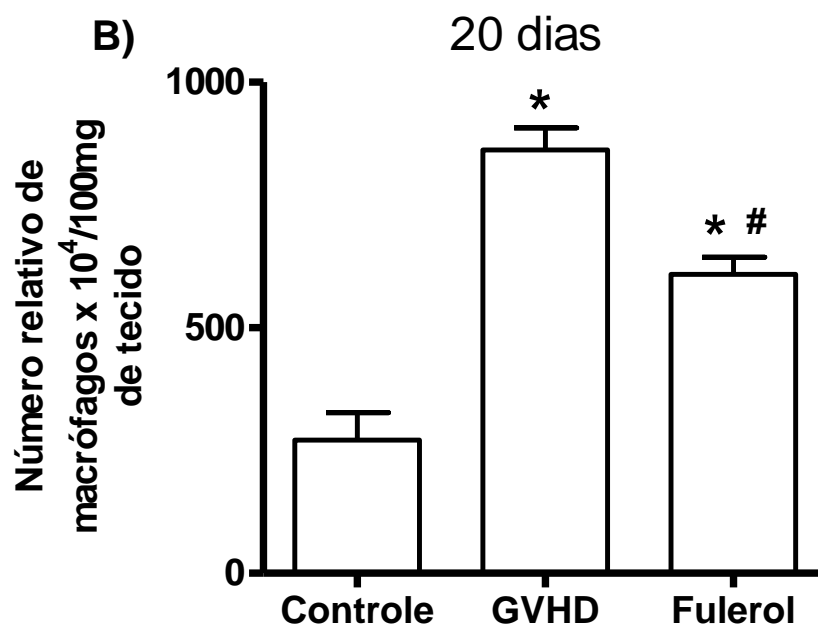
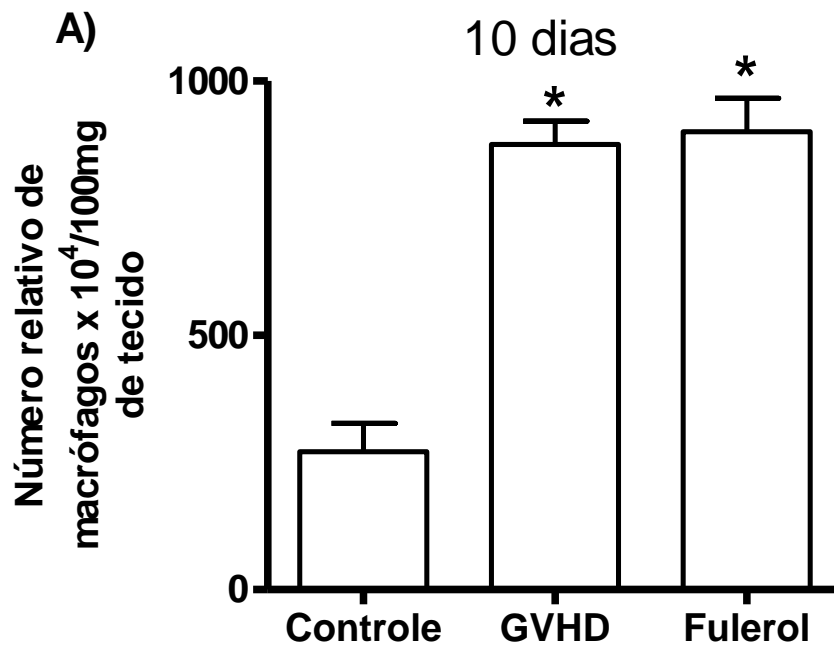


Figura 10 - O tratamento com fulerol reduziu os níveis de quimiocinas e citocinas envolvidas na GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Camundongos foram sacrificados, dez e vinte dias após a indução da doença e os níveis de IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL3 e CCL5 no fígado foram avaliados por ELISA. Níveis de IFN- γ dez dias (A), vinte dias (B), TNF- α dez dias (C) vinte dias (D), CCL2 dez dias (E) vinte dias (F), CCL3 dez dias (G), vinte dias (H) e CCL5 dez dias (I), vinte dias após o transplante (J). Resultados são apresentados como média \pm SEM. *P<0.05 comparado ao controle n=4 e #P<0.05 comparado ao GVHD n=5.

5.4) Acúmulo de leucócitos em órgão alvo da GVHD

O acúmulo de leucócitos foi analisado no fígado, através da quantificação indireta do número macrófagos e de neutrófilos, verificada pela atividade da n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) e da mieloperoxidase (MPO), respectivamente. Camundongos que desenvolveram GVHD com ou sem tratamento, apresentaram acúmulo de leucócitos no fígado quando comparados ao grupo controle, dez e vinte dias após a indução da doença. O

tratamento com o fulerol reduziu significativamente o acúmulo desses leucócitos, vinte dias após o transplante, quando comparado ao grupo GVHD não tratado (figura 11 A-D).



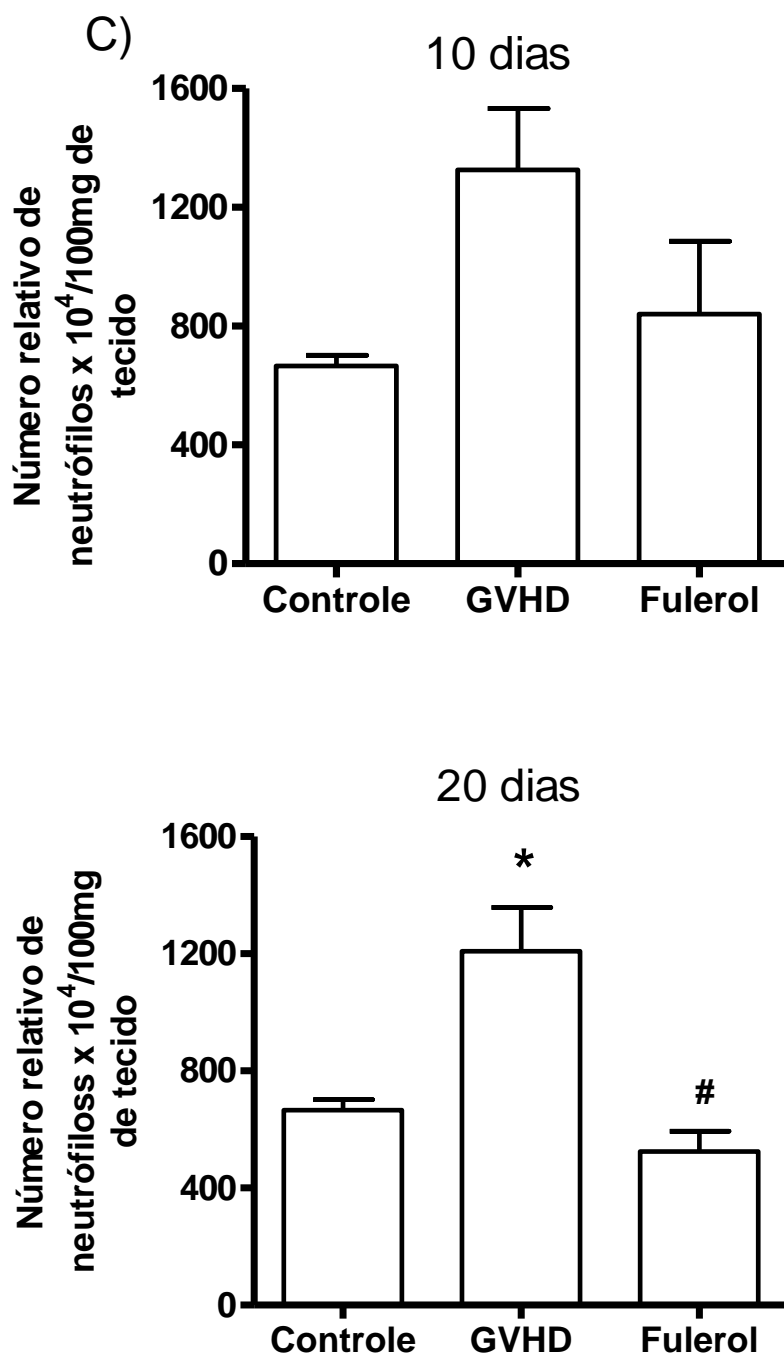
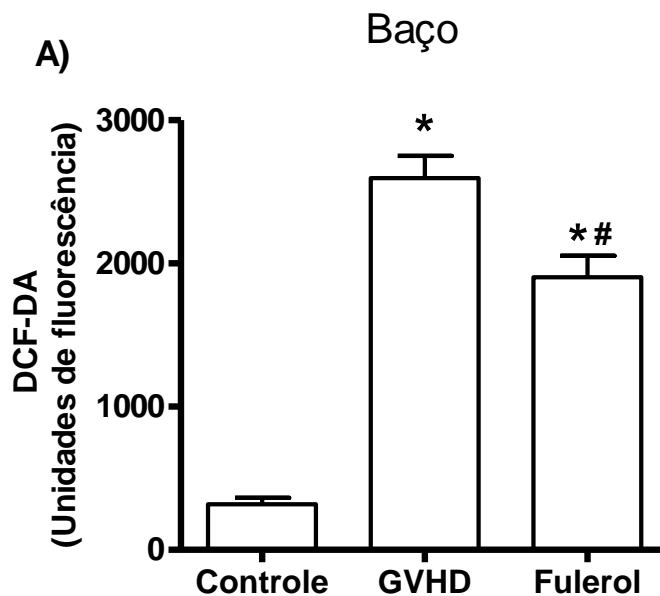


Figure 11 – O tratamento com fulerol diminuiu o acúmulo de leucócitos no fígado de camundongos que desenvolveram GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Amostras do fígado foram coletadas

10 e 20 dias após o transplante e o acúmulo de macrófagos e neutrófilos foi analisado neste tecido através da atividade da **n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)** e **mieloperoxidase (MPO)**, **respectivamente**. Número relativo de macrófagos 10 dias (A) 20 dias após o transplante (B). Números relativo de neutrófilos 10 dias (C) 20 dias após o transplante (B). Resultados são apresentados como média ± SEM. *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD n=6.

5.5) Produção de espécies reativas de oxigênio

Com o objetivo de verificar se a atividade antioxidante do fulerol poderia exercer efeitos sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio na GVHD, ROS foram mensuradas em dois órgãos alvo da GVHD: fígado e baço, vinte dias após o transplante. Os animais do grupo GVHD apresentaram níveis de ROS aumentados em relação ao grupo controle. Entretanto, notou-se que os animais tratados com o fulerol tiveram níveis significativamente menores de ROS nos órgãos analisados, quando comparado ao grupo GVHD (figura 12 A-B).



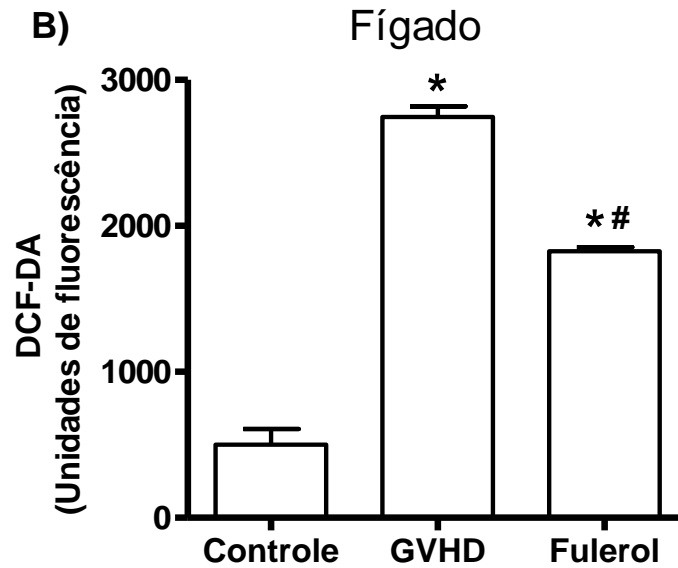


Figura 12 – O tratamento com o fulerol diminuiu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), em órgãos alvos da GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol (10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. No 20º dia após o transplante, camundongos de todos os grupos foram sacrificados e os níveis de ROS mensurados por quimioluminescência, no baço (A) e fígado (B). Resultados são apresentados como média \pm SEM. *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD n=6.

5.6) Efeito do tratamento com apocinina na GVHD

Diante da alta taxa de sobrevivência, diminuição dos sinais clínicos e parâmetros inflamatórios analisados, adicionado a um menor nível de ROS nos animais tratados com o fulerol, resolveu-se verificar se a atividade antioxidante do fulerol poderia ser um mecanismo de proteção da GVHD. Realizou-se, então, um tratamento com um inibidor da atividade do complexo NADPH oxidase, a apocinina (03mg/Kg/dia) para análise da sobrevivência dos

animais e sinais clínicos da GVHD. Coincidentemente, os animais tratados com apocinina tiveram menor letalidade e diminuição da graduação clínica da doença (Figura 13 e 14 A). Ressalta-se que mesmo após cessar o tratamento com apocinina (encerrou-se o tratamento trinta dias após o transplante), a taxa de sobrevivência continuou sendo a mesma (60%) neste grupo (este experimento foi encerrado cinquenta dias após a indução da doença). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com apocinina e o grupo GVHD, quando analisado a variação de perda de peso (figura 14 B).

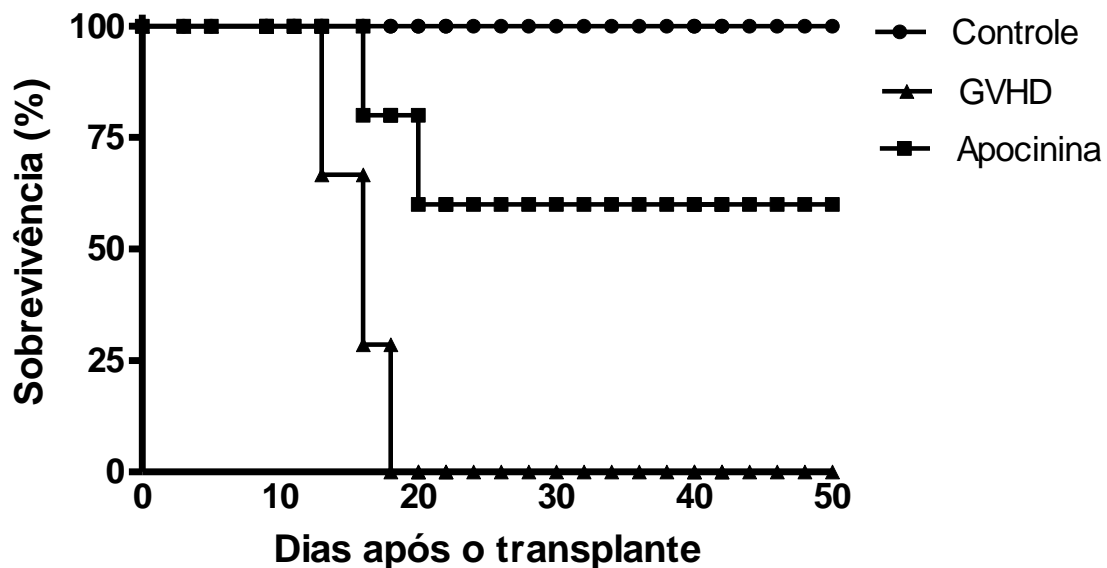


Figura 13 – O tratamento com apocinina diminuiu a mortalidade da GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v), e foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com apocinina (3 mg/Kg) de 24 a 24 horas, por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do transplante até o 30º dia após a indução da doença. O grupo controle do transplante foi realizado utilizando-se camundongos B6D2F1 que receberam células de camundongos também B6D2F1 e não desenvolveram a GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para controle da mortalidade. * $P < 0.05$ comparado ao controle e # $P < 0.05$ comparado ao GVHD, n=5 e controle n=4.

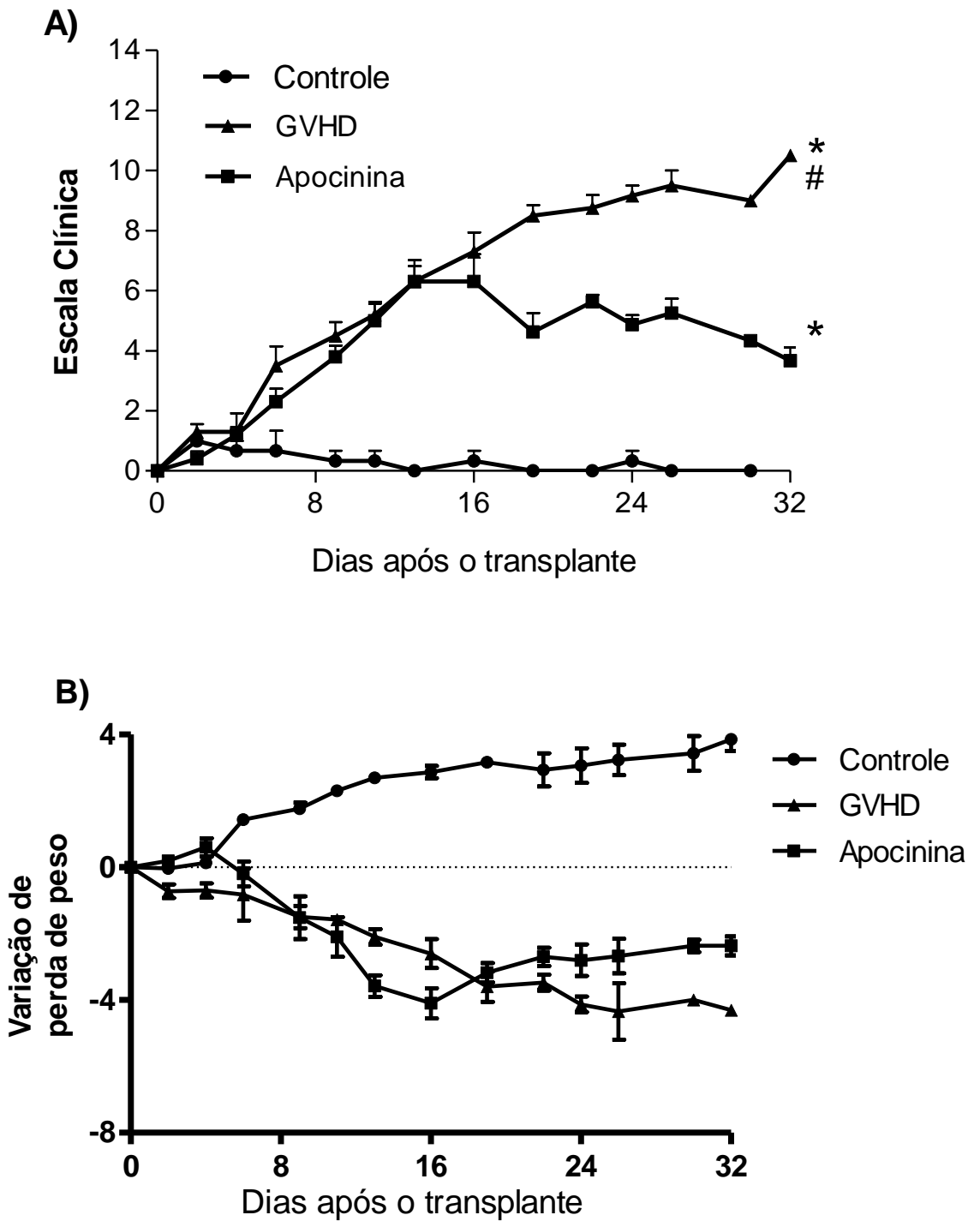
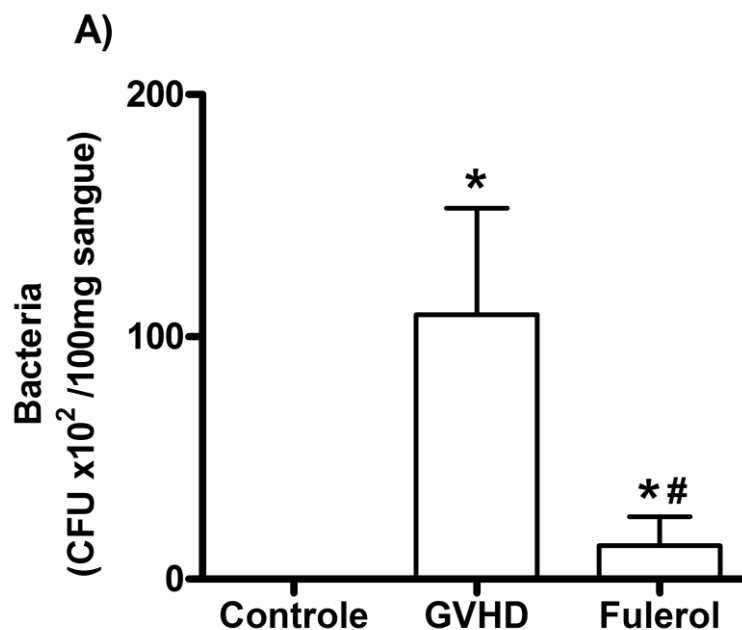


Figura 14 – Efeito do tratamento com apocinina sobre os sinais clínicos e peso dos animais que desenvolveram GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v), e foram divididos em 02 grupos: GVHD e

GVHD tratados com apocinina (3mg/Kg) de 24 a 24 horas, por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do trasplante até o 30º dia após a indução da doença. O grupo controle do transplante foi realizado utilizando-se camundongos B6D2F1 que receberam células de camundongos também B6D2F1e não desenvolveram a GVHD. Após a indução da doença os camundongos foram monitorados a cada 2 dias para o controle dos sinais clínicos. Graduação clínica da GVHD (parâmetros clínicos avaliados foram descritos em material e métodos) (A). Variação de perda de peso dos animais (B). *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD, n=5.

5.7) Efeito do fulerol na translocação Bacteriana

Camundongos tratados com fulerol tiveram um menor número de unidade formadora de colônia (CFU) de bactérias na cavidade abdominal, no sangue e no fígado quando comparados aos camundongos que receberam células selvagens e foram tratados apenas com PBS, verificada no vigésimo dia após o transplante (Figura 15 A-C).



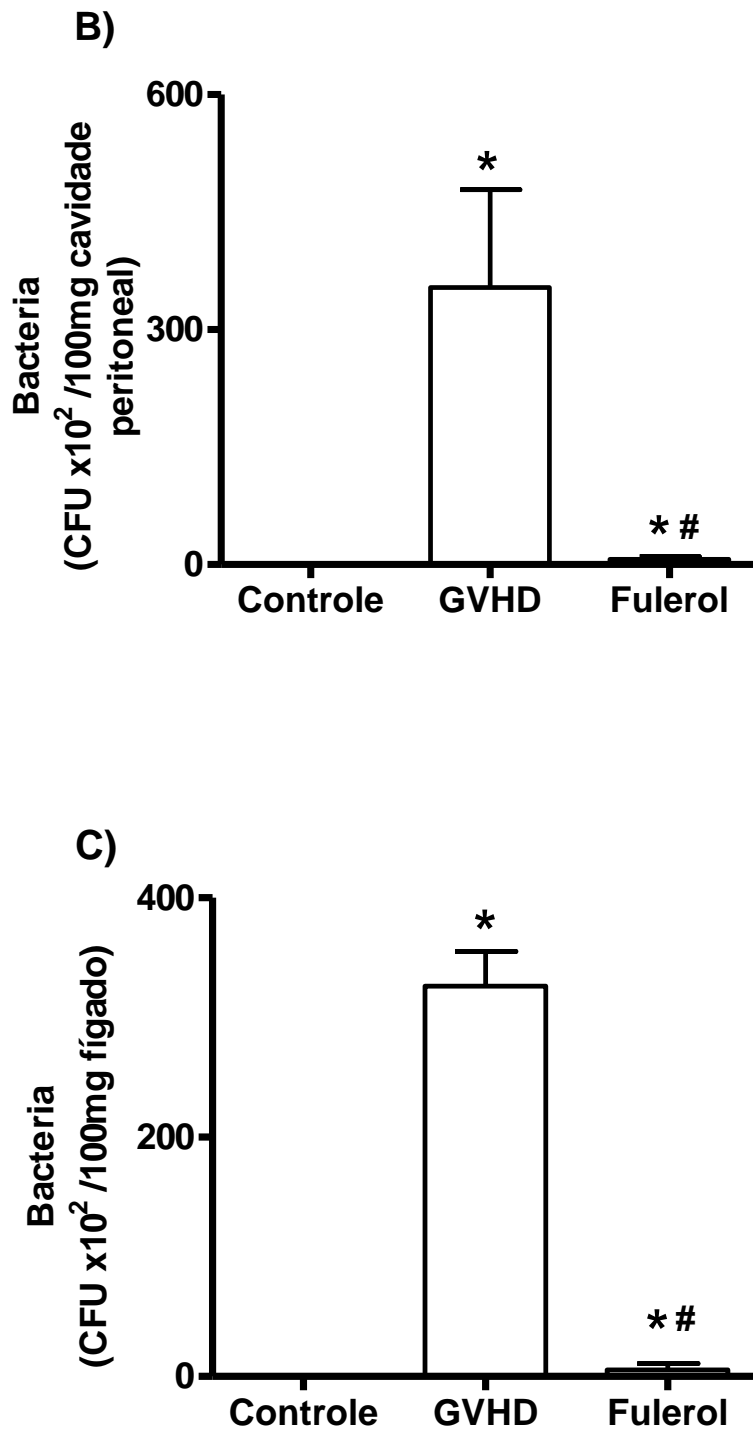


Figura 15 – O tratamento com fulerol diminuiu a translocação bacteriana na cavidade abdominal, sangue e fígado de camundongos que desenvolveram GVHD. A doença foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos de camundongos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1, irradiados 02 dias antes do transplante, por via intravenosa (i.v). Os camundongos foram divididos em 02 grupos: GVHD e GVHD tratados com fulerol

(10mg/Kg) de 48 a 48 horas, por via intraperitoneal (i.p). O grupo controle do transplante recebeu células singênicas de camundongos B6D2F1 e não desenvolveu a GVHD. Vinte dias após a indução da doença, camundongos foram sacrificados e o número de unidade formadora de colônia (CFU) de bactéria foi verificado no sangue (A) na cavidade abdominal (B) e no fígado (C). Resultados são apresentados como média \pm SEM. *P<0.05 comparado ao controle e #P<0.05 comparado ao GVHD n=6.

6) DISCUSSÃO

A Doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) constitui a maior causa de mortalidade e morbidade pós-transplante de células hematopoiéticas (TCH), ocorrendo em aproximadamente metade dos pacientes submetidos ao TCH alogênico (Ferrara e cols., 2009).

O tratamento farmacológico padrão para a GVHD inclui o uso de altas doses de corticosteróides em combinação com drogas imunossupressoras e estão relacionados com a supressão da atividade de citocinas (Devetten e Vose, 2004; Ferrara e cols., 2006). Entretanto, o uso de altas doses de corticosteróides provocam diversos efeitos colaterais e danos metabólicos, incluindo hiperglicemia, retenção de líquidos, enfraquecimento muscular e aumento de infecções (Ferrara e cols., 2006), sendo que o sucesso desta terapia ainda não é satisfatório (40% dos casos). Cerca de 50% dos pacientes tratados por corticosteróides desenvolvem GVHD refratária a corticosteróides (Ferrara e cols., 2006, 2009; Choi e cols., 2010, 2011) e têm um alto risco de morte, tanto por GVHD propriamente dita, quanto por infecções secundárias, necessitando de outras terapias para o tratamento da doença (Ferrara e cols., 2006). Neste contexto, foram desenvolvidas terapias com anticorpos monoclonais para o receptor de IL-2 (daclizumab) e também para o TNF- α (entanercept) e seus precursores (infiximab) assim como, combinações de proteínas compostas por IL-2 humana mais toxina diftérica (denileukin diftitox). Todas essas estratégias têm o objetivo de complementar a terapia com corticosteróide (Devetten e Vose, 2004; Choi e cols, 2010, 2011). Métodos de depleção farmacológicos como depleção de células T, através da globulina antitimocítica (ATG, do inglês *antithymocyte globulin*) também têm sido usados para tentar reduzir a incidência de GVHD aguda. Entretanto, apesar de reduzirem a GVHD em pacientes, estes tratamentos podem aumentar a incidência de infecção, contribuindo para a morbidade e mortalidade dos mesmos (Jacobsohn, 2002).

Diante das limitações das terapias atuais da GVHD torna-se necessário aprofundar o entendimento nos mecanismos patológicos desta doença obtendo modos mais eficazes de interferir na sua evolução ou até mesmo impedir o seu aparecimento. Sendo assim, o nosso estudo teve por objetivo verificar o efeito do nanocomposto fullerol no desenvolvimento da patogênese da doença do enxerto-versus-hospedeiro e verificar se o seu uso poderia trazer benefícios como uma forma de tratamento para a doença, baseado nos potenciais efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes deste nanocomposto (Dugan e cols., 2001; Injac e cols., 2008; Quick e cols., 2008, Yudoch e cols, 2009). Com essa finalidade utilizamos um modelo experimental de GVHD, anteriormente descrito na literatura, no qual a injeção de esplenócitos de camundongos parentais C57BL/6J em camundongos B6D2F1, previamente irradiados, leva ao desencadeamento da GVHD aguda (Castor e cols., 2010, 2011; El-Hayek e cols., 2005; Vodanovic-Jankovic e cols., 2006). Esse modelo experimental tem como objetivo mimetizar a reação que pode ocorrer após o transplante de medula óssea e outros órgãos, na qual o enxerto se torna ativado e reage contra o hospedeiro, levando à lesão de diversos órgãos alvo do paciente podendo levar à morte.

Neste estudo demonstramos que o tratamento com fullerol em camundongos levou a uma redução da GVHD, observada pela diminuição da graduação dos sinais clínicos e da mortalidade. É importante salientar que o fullerol foi eficaz em reduzir, mas não abolir a doença, comprovado pela ocorrência de alguns sinais clínicos da GVHD nos animais tratados. Após aproximadamente dez dias do transplante, observou-se que animais tratados com o fullerol começaram a apresentar melhora significativa quando comparados aos animais do grupo GVHD, sendo que os sinais clínicos analisados tais como o eriçamento e a perda da vitalidade dos pêlos, a diarreia, a ocorrência de sangue nas fezes, a apatia e a postura do tronco em flexão foram menos intensos, tendo uma graduação média significativamente menor durante a evolução da doença. De fato, sabe-se que a diminuição e não a ausência da

GVHD é interessante, uma vez que as células doadas são importantes para o reconhecimento e destruição das células tumorais do receptor, ou seja, é necessário que se desenvolva uma resposta contra o tumor (GVT), eliminando as células tumorais remanescentes da quimioterapia ou radioterapia (Johnson e cols., 1999; Kolb e cols., 2008).

A variação da perda de peso também foi um parâmetro clínico analisado na GVHD. Não houve diferenças significativas entre os grupos GVHD e fulerol. Todavia, a partir do vigésimo dia após a indução da doença os animais tratados com fulerol começaram a recuperar gradativamente o peso perdido. A perda de peso é uma característica comum da GVHD e pode estar associada à diarreia, distúrbios intestinais e hepáticos que ocorrem nesta doença. O aumento de TNF α na GVHD é um fator que pode contribuir para a perda de peso dos animais. O fator de necrose tumoral (TNF α), também conhecido por caquexina, está associada à inibição da lipase lipoprotéica, aumentando a lipólise e a depleção de tecido adiposo e muscular em animais e humanos (Inadera e cols., 2002; Tisdale., 2002; Rubin H., 2003). Ressalta-se que o comportamento alimentar e parâmetros metabólicos, tais como glicemia de jejum, resistência à insulina, níveis de ácidos graxos séricos, perda de tecido adiposo e de massa corporal, gasto energético entre outros, ainda não foram avaliados em animais com GVHD, o que poderia ser interessante para melhor compreender a perda de peso e possíveis alterações metabólicas nestes animais.

A disfunção hepática é um acometimento comum após o transplante de células hematopoiéticas e é um dos sinais clínicos da GVHD (Kim e cols., 2000; Fujii, 2001). Os parâmetros inflamatórios analisados no fígado, tais como: histologia, produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, translocação bacteriana, acúmulo de leucócitos e produção de espécies reativas de oxigênio apresentaram-se diminuídas, a partir do vigésimo dia após o transplante, refletindo assim, na sobrevivência e melhora clínica dos animais.

O fulerol possui um potencial antioxidante, devido sua estrutura simétrica e estável, ele torna-se um excelente acceptor de elétrons e com isto bastante eficiente em capturar radicais livres, funcionando como uma “esponja de radicais livres” (Felde-Flesh e cols., 2006; Krusic e cols., 1991). Pacientes com câncer frequentemente são submetidos ao tratamento com um antibiótico denominado doxorubicina (DOX). A DOX, entretanto apresenta alguns efeitos colaterais, tais como toxicidade em vários órgãos, como o coração e fígado. Sugere-se que sua citotoxicidade no tecido hepático e cardíaco deve-se principalmente a sua capacidade de gerar radicais livres (Saade e cols, 2001; Yagmurca e cols., 2007; Bulucul e cols, 2009). Diante da limitação ao uso de DOX e considerando o efeito antioxidante dos fuleróis, Injac e colaboradores (2008, 2009) investigaram o efeito deste nanocomposto sobre a toxicidade da DOX usando um modelo de carcinoma mamário em ratos, tratados por DOX. Eles demonstraram que o fulerol em condições de aumento de estresse oxidativo, proporcionado pela DOX, exerceu um efeito hepatoprotetor nestes animais, observadas através da redução dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato (AST) desidrogenase de lactato (LDH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Além disto, quando analisado o tecido cardíaco destes animais, verificou-se uma diminuição de alguns marcadores típicos para o dano oxidativo, tais como, SOD, CAT, malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH), apontando assim para um efeito cardioprotetor dos fuleróis na toxicidade aguda induzida por DOX. Baseados na atividade antioxidante que os fulerenos e seus derivados possuem ao limitar os efeitos nocivos de radicais livres gerados após lesões neuropatológicas (Dugan e cols, 2001; revisado por Silva, 2006), o uso do fulerol como terapia em desordens neurodegenerativas tem sido elucidado por alguns estudos. Devido à capacidade em capturar radicais livres, o fulerol pode exercer efeitos positivos em doenças como Parkinson e Alzheimer, nas quais há uma produção aumentada de ROS. O efeito neuroprotetor que o fulerol exerce nestas doenças deve-se a sua capacidade em reagir com

espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot), diminuindo a morte neuronal (Bosi e cols., 2003).

Diante do potencial antioxidante do fulerol, investigamos o efeito deste nanocomposto sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio em dois órgãos alvo da GVHD: baço (órgão linfoide secundário) e fígado. Animais que desenvolveram GVHD apresentaram aumento nos níveis de ROS, nos dois órgãos analisados, vinte dias após a indução da doença, quando comparado ao grupo controle. Em contraste o tratamento com o fulerol, diminuiu significativamente os níveis de ROS no fígado e baço de animais com GVHD, o que poderia ser explicado pela atividade antioxidante deste nanocomposto. Coincidentemente, ao se usar outro antioxidante, a apocinina observou-se também um aumento em 60% da taxa de sobrevivência de animais com GVHD tratados com apocinina, associado a uma melhora significativa dos sinais clínicos da doença, apesar de não haver diferenças significativas na perda de peso dos animais com GVHD tratados e não tratados em este antioxidante. Em um estudo sobre estresse oxidativo de células do sangue após o transplante de células hematopoiéticas (TCH), Amer e colaboradores (2007) mostraram que na GVHD as células sanguíneas (polimorfonucleares e linfócitos) de animais submetidos ao transplante semi-alogênico estavam sob condições de estresse oxidativo, com níveis bastante aumentados de ROS. Segundo Kohen e colaboradores (2002), enquanto que, em baixas concentrações, ROS seria necessário para processos celulares vitais, em altas concentrações as espécies reativas de oxigênio estariam envolvidas nos efeitos deletérios, como a estimulação da formação de peróxido de hidrogênio e da peroxidação dos lipídeos da membrana, o que resultaria em lesão e destruição de tecidos e órgãos. Níveis aumentados de radicais livres e a depleção de antioxidantes intra e extracelulares estariam entre os principais mecanismos que mediam danos a órgãos, como pulmão e fígado, após o TCH (Weij e cols., 1997; Amer e cols., 2007). Além disto, estudos em animais e humanos demonstram que altos níveis de ROS são

observados em doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares e Diabetes Mellitus (Reuter e cols., 2010; Monlavi e cols., 2004; Calles e cols., 2001). Em modelos de isquemia e reperfusão hepática em murinos, em que há aumento de ROS, o uso de inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio, seja pela inibição da xantina oxidase (geradora de ânion superóxido), como o alopurinol, (Rhoden e cols., 2000) ou pela apocinina (Liu e cols., 2008), provocou uma diminuição significativa da produção de ROS levando assim a uma maior proteção do fígado, com diminuição de vários parâmetros inflamatórios, tais como: menor produção de TNF- α e redução do infiltrado celular, do processo degenerativo e necrótico neste órgão.

Corroborando com dados acima, a diminuição de ROS no fígado de animais com GVHD tratado com fulerol esteve associada a uma menor lesão hepática observadas nas lâminas histopatológicas, vinte dias após a indução da doença. Estudos experimentais de lesões hepáticas causadas por DOX mostraram que o tratamento com fulerol diminuiu espécies reativas de oxigênio no fígado, exercendo um efeito protetor sobre este órgão (Injac e cols., 2008, 2009). Dessa forma, nossos resultados ressaltam um importante papel terapêutico do fulerol na GVHD. A propriedade anti-inflamatória do fulerol também é foco de um estudo realizado por Yudoh e colaboradores (2009), no qual o fulerol pode ser um agente terapêutico importante na artrite reumatóide. O tratamento com fulerol diminuiu níveis de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , diminuindo assim a destruição articular e sinovial provocadas em modelo de ratos induzidos por atrite.

Em nosso trabalho o tratamento com fulerol, alterou os níveis de citocinas e quimionas pró-inflamatórias na GVHD. Associado a diminuição da lesão histopatológica no fígado e a redução de ROS neste órgão, está relacionada a uma redução significativa nos níveis de TNF α e IFN- γ no fígado de camundongos que receberam tratamento com fulerol, vinte dias após o transplante. TNF α e IFN- γ participam de forma importante na patogênese da

GVHD (Cooke e cols., 2001; Wysocki e cols., 2005; Jaksch e Mattson e cols., 2005; El-Hayek e cols.; 2005, Bouazzaoui e cols., 2009; Castor e cols, 2010, 2011). A importância do TNF α no desenvolvimento da GVHD tem sido apoiada por uma série de experimentos clínicos que demonstram uma forte correlação entre níveis aumentados desta citocina e à doença do enxerto (Lebine, 2011). A correlação entre os altos níveis de IFN- γ e TNF α e a gravidade da GVHD sugere o envolvimento destas citocinas na patogênese desta doença. Sendo assim, os efeitos do fulerol nos níveis de TNF α e IFN- γ tornam-se relevantes para o desenvolvimento da GVHD em camundongos. O tratamento com o fulerol em animais que desenvolveram GVHD também foi eficiente em reduzir os níveis de CCL2, CCL3 e CCL5 no fígado destes animais, vinte dias após o transplante. Estas quimiocinas são importantes na participação dos processos de ativação e recrutamento de leucócitos para sítios inflamados e estão associadas à lesão dos órgãos alvos na GVHD (Serody e cols., 2000; Wysock e cols., 2005; Jaksch e Mattson, 2005; Choi e cols., 2010, Bouazzaoui e cols., 2009). A CCL3 é uma quimiocina importante para doença clínica e letalidade associadas à GVHD, conforme demonstrado por Serody e colaboradores (2000). De acordo com estes estudos a transferência de esplenócitos deficientes em CCL3 foi associada à diminuição dos sinais clínicos da GVHD e da mortalidade (Serody e cols., 2000). Terapias baseadas no bloqueio da CCL3 também foram eficazes no controle da GVHD em murinos, minimizando os sinais clínicos da doença e aumentando a taxa de sobrevivência dos animais (Castor e cols., 2010). Em nosso modelo experimental, camundongos submetidos à GVHD apresentaram aumento na produção de citocinas, dentre elas a CCL2. Terwey e colaboradores (2005) relataram que o receptor para a citocina CCL2 (CCR2) tem um importante papel na ativação e migração de células T CD8⁺ no intestino e fígado de animais submetidos á GVHD. O papel desta quimiocina na GVHD, entretanto ainda não é bem estabelecido. Por participar do recrutamento e da proliferação de células T aloespecíficas em órgãos alvo da GVHD, ressalta-se aqui o papel da CCL5 no

desenvolvimento desta doença. Choi e colaboradores (2007) estudaram a função da quimiocina CCL5 e seu receptor CCR1 na GVHD. Eles observaram que a expressão do RNAm para CCR1 estava aumentada em animais com GVHD e isso se correlacionava com um aumento da lesão no intestino e no fígado desses animais. A ausência de CCR1 e da sua interação com o seu ligante (CCL5) estava relacionada a uma maior sobrevivência dos camundongos com GVHD, a uma menor manifestação dos sinais clínicos da doença, a uma menor liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IFN- γ , a uma menor expansão das células T no baço e ainda, a um maior recrutamento de mononucleares e neutrófilos para o intestino e o fígado desses animais. Deste modo, a diminuição de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelo fulerol também podem contribuir para a proteção dos órgãos alvo e mortalidade associada à GVHD. Esta diminuição nos níveis de quimiocinas pode estar associada com a redução do acúmulo de leucócitos observados no fígado de animais tratados com o fulerol, após o vigésimo dia do transplante. Como demonstrado por alguns autores: Serody e cols., 2000; Wysocki e cols., 2005; Jaksch e Mattsson, 2005, o recrutamento de leucócitos exerce um importante papel na fase efetora da GVHD, levando a uma maior destruição dos tecidos do hospedeiro e a uma maior produção de mediadores inflamatórios, sendo, portanto, responsáveis pela perpetuação da doença que culmina com o óbito do animal. Sendo assim, este estudo se propôs a avaliar o efeito do fulerol sobre o acúmulo de leucócitos para um órgão alvo desta doença. O acúmulo de macrófagos e neutrófilos para o fígado dez dias após o transplante foi similar entre os grupos GVHD tratados e não tratados com o fulerol. Entretanto, no período do início da mortalidade (vinte dias após a indução da GVHD) observou-se que animais do grupo sem tratamento apresentavam um maior número destes leucócitos quando comparado ao grupo fulerol. A migração de leucócitos é um dos principais mecanismos de lesão dos órgãos alvo da GVHD, interferindo de maneira direta na mortalidade associada à doença (Lu e cols., 2010; Ferrara e cols., 2005, 2006 e 2009),

portanto, controlar o recrutamento e acúmulo destas células em órgãos alvo é uma importante estratégia terapêutica para a GVHD e este objetivo foi alcançado com o tratamento utilizando com fulerol.

Outro achado interessante foi o menor número de unidade formadora de colônia (CFU) de bactéria encontrada na cavidade abdominal, no sangue e no fígado de camundongos tratados com fulerol, no vigésimo dia após a indução da GVHD. A translocação bacteriana é um agravante da GVHD podendo levar à morte (Beelen e cols., 1999). A atividade antimicrobiana do fulerol também tem sido investigada por alguns autores (Mashino e cols., 1999; Tang e cols, 2007; Kumar e Menon, 2009). Tang e colaboradores (2007) demonstraram que um provável mecanismo pelo qual estes nanocompostos podem inibir o crescimento bacteriano é através da sua interação e destruição com a membrana celular de bactérias. Entretanto, esse mecanismo não foi investigado em nosso trabalho e acreditamos que seu papel anti-oxidante seja o mecanismo mais relevante na proteção contra a GVHD.

O uso do fulerol como estratégia no controle da resposta inflamatória associada à GVHD foi bastante satisfatório, uma vez que levou a uma atenuação de todos os parâmetros inflamatórios e clínicos investigados neste estudo, mostrando assim a relevância deste tratamento. Outros estudos a respeito do mecanismo de ação do fulerol em modelos animais e também em células humanas devem ser realizados a fim de torná-lo uma terapia utilizada para ajudar no tratamento de pessoas acometidas por esta doença.

7) CONCLUSÃO

O tratamento com o fulerol diminuiu a resposta inflamatória, resultando em aumento da sobrevivência e diminuição dos sinais clínicos associados à GVHD aguda em camundongos. De maneira semelhante o uso de um agente antioxidante, apocinina, também levou à melhora dos camundongos com GVHD, sugerindo que estratégias que atuem sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS), podem ser importantes no controle desta doença. Sendo assim, o fulerol pode ser uma estratégia promissora a ser utilizada no tratamento da GVHD.

PERSPECTIVAS

Diante da proteção exercida pelo fulerol em camundongos com GVHD, propomos investigar quais seriam os mecanismos celulares pelos quais este nanocomposto estaria atuando e, em consequência, exercendo este efeito protetor. Para isto será avaliado o recrutamento de células inflamatórias utilizando microscopia intravital e imunohistoquímica e o perfil de células T para órgãos alvo da doença.

Visto que as espécies reativas de oxigênio estão aumentadas em órgãos alvo da GVHD e quando diminuídas pelo fulerol proporcionaram um aumento da sobrevida e diminuição dos sinais clínicos da doença em camundongos, pretendemos investigar o papel de ROS no desenvolvimento e patogênese da doença do enxerto versus hospedeiro. Para isto, utilizaremos estratégias farmacológicas que interfiram nas vias da formação de ROS e animais deficientes gp91phox^{-/-} (gp91phox é uma subunidade do complexo multienzimático NADPH oxidase).

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, CG; LADEIRA, OLA; ARIETE, AR; KRAMBROCK,K; HÁLLEN, D; ROSSI, CB; FREITAS, MP; GIL ; PINHEIRO, BVM. Synthesis of C60(OH)18-20 in Aqueous Alkaline Solution Under O₂-Atmosphere. *J. Braz. Chem. Soc*, v.17, n. 6, p.1187-1191, 2006.

AMER, J; WEISS, L; REICH, S; SHAPIRAY, M; SLAVIN, S; FIBACH, E. The oxidative status of blood cells in a murine model of graft-versus-host disease. *Ann Hematol* v. 86, p.753–758, 2007.

BALL, LM; EGELER RM. On behalf of the EBMT Pediatric Working Party Acute GVHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplantation*, v.41, p:S58-S64, 2008.

BEELEN, DW; ELMAAGACLI, A; MULLER, KD; HIRCHE, H; SCHAEFER, UW. 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*, v. 93, p.3267–75, 1999.

BOUAZZAOUI, A; SPACENKO, E; MULLER, G; MIKLOS, S; HUBER, E; HOLLER, E; ANDREESEN, R; HILDEBRANDT GC. Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease. *Genes and Immunity*, v.10, n.8, p.10687-701, 2009.

BOSI, S; DA ROS, T; SPALLUTO, G; PRATO, M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, p. 913-923, 2003.

BULUCU, F; RAMAZAN, OCAL; KARADURMUS, N; SAHIN, M; KENAR, K; AYDIN, A; OKTENLI, C; KOC , B; INAL, K; YAMANEL, L; YAMAN, H. Effects of N-Acetylcysteine, Deferoxamine and Selenium on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity. *Biol Trace Elem Res*, v. 132, p.184–196, 2009.

CAGLE, DW; THRASH, TP; ALFORD, M; CHIBANTE, LPF; EHRHARDT, GJ; WILSON, LJ. Synthesis, Characterization, and Neutron Activation of Holmium Metallofullerenes, *J. Am. Chem. Soc.*:v.118, p. 8043-8047, 1996.

CAGLE, DW; ALFORD JM; WILSON, LJ. Metallofullerene Sample Analysis by Mass Spectrometry (LD-TOF MS), Neutron-Activation Analysis (NAA) and Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AE), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, p. 5182–5187, 1999.

CALLES-ESCANDON, J; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*. v. 22, n.1, p. 36-52, 2001.

CASTOR, MGM; REZENDE, B; RESENDE, CB; ALESSANDRI, AL; FAGUNDES, CT; SOUSA, LP; ARANTES, REM; SOUZA, DG; SILVA, TA; PROUDFOOT, AEI; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. The CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1 α -Binding Protein Evasin-1 Protects from Graft-versus-Host Disease but does Not Modify Graft-versus-Leukemia in Mice, *The J Immunol*, v.184, p.2646-2654, 2010.

CASTOR, MGM; REZENDE, BM; BERNARDES, PTT; VIEIRA, AT; VIEIRA, ELM; ARANTES, REM; SOUZA, DG; SILVA, TA; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. PI3K-controls leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality in a model of graft-versus-host disease in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v.89, p. 955- 08, 2011.

CHIANG, LY; LU, FJ; LIN, JT. Free radical scavenging activity of water soluble fullerenols. *J Chem Soc Commun*, v.I, p. 1283-1284, 1995.

CHOI, SW; HILDEBRANDT, GC; OLKIEWICZ, KM; HANAUER, DA; CHAUDHARY, MN; SILVA, IA; ROGERS, CE; DEURLOO, DT; FISHER, JM; LIU, C; ADAMS, D; CHENSUE, SW; COOKE, KR. CCR1:CCL5 (RANTES) receptor ligand interactions modulates allogeneic T cell responses and reduces graft-versus-host disease following stem cell transplantation. *Blood*, v. 110, p.3447–3455, 2007.

CHOI, SW; LEVINE, JE; FERRARA, JLM. Pathogenesis and Management of Graft-versus-Host Disease. *Immunol Allergy Clin N Am*, v.30, p. 75–101, 2010.

CHOI, JH; YOON, H; MIN, CK; CHOI, EY. Effects of pre-conditioning dose on the immune kinetics and cytokine production in the leukocytes infiltrating GVHD tissues after MHC-matched transplantation. *Immun. Netw.* v. 11, p. 68-78, 2011.

COLSON, YL; CHRISTOPHER, K; GLICKMAN, J; TAYLOR, KN; WRIGTH, R; PERKINS, DL. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood*, v. 104, p.3829-3835, 2004.

COOKE, KR; GERBITZ, A; CRAWFORD, JM; TESHIMA, T; HILL, GR; TESOLIN, A.; ROSSIGNOL, DP; FERRARA JL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* V. 107, n.12, p.1581-9, 2001.

DA ROS, T; PRATO, M; NOVELLO, F; MAGGINI, M; BANFIE, E. Easy Access to Water Soluble Fullerene Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azomethine Ylides to C60. *J. Org. Chem.*, v. 61, p.9070-9072, 1996.

DA ROS, T; PRATO, M. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chem. Commun*, p.663–669, 1999.

DAVIS, P; HEBER, D; PARCKER, L. Oxidation and antioxidation in cancer. **Nutricional oncology**, p. 297-305, 2006.

DEVETTEN, MP; VOSE, JM. Graft-versus-host disease: how to translate new insights into new therapeutic strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v.10, p.815-825, 2004.

DUGAN, LL.; LOVETT, KL; QUICK, J; LOTHARIUS, TT; .O'MALLEY KL. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 7, n.3, p. 243-246, 2001.

EL-HAYEK, JM; ROGERS, TE; BROWN, GR. The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8⁺ T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. *J Leukocyte biol.* v.78, p.1001-1007, 2005.

FERRARA, JL; DEEG, HJ. Graft- versus host disease. *N. Engl. J. Med*, n.324, p. 667-74, 1991.

FERRARA, JL; YANILK, G. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol*, v.5, n.3, p.415-419, 2005.

FERRARA, JL; REDDY, P. Pathophysiology of Graft-Versus-Host Disease. *Semin. Hematol*, v.43, n.1, p. 3-10, 2006.

FERRARA, JL. Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v.20,p.91-97, 2007.

FERRARA, JL; LEVINE, JE; REDDY, P; HOLLER, E. Graft-versus-Host disease. *Lancet*, v373, p. 1550-61, 2009.

FUJII, N; TAKENAKA, K; SHINAGAWA, K; IKEDA, K; MAEDA, Y; SUNAMI, K; HIRAMATSU, Y MATSUO, K; ISHIMARU, F; NIYA, K; YOSHINO, T; HIRABAYASHI, N; HARADA, M. Hepatic graft-versus-host disease presenting as an acute hepatitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, v. 27, p. 1007–1010, 2001.

GOLDIN, H; KEISARI, Y. Increased oxidative burst potential exhibited by macrophages during graft-versus-host reactions in mice. *Transplantation*, v. 41, n.6, p. 755-8, 1986.

HIGASHI, N; INOUE, T; NIWA, M. Immobilization and cleavage of DNA at cationic, self-assembled monolayers containing C60 on gold. *Chem. Commun*, p.1507-1508, 1997.

HILL, GR; CRAWFORD, JM; COOKE, KR; BRINSON, YS; PAN, L; FERRARA, JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*, n. 90, p. 3204–13, 1997.

HOWARD, JG; WOODRUFF, MFA. Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. Lond*, n. 154, p. 532-9, 1961.

INADERA, H; NAGAI, S; DONG, HY; MATSUSHIMA, K. Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model. *Int J Cancer*, v.101, n.1, p.37-45, 2002.

INJAC, R; PERSE, M; OBERMAJE, N; DJORDJEVIC-MILIC, V; PRIJATELJ, M; DJORDJEVIC, A; CERAR, A; STRUKELJ, B. Potential hepatoprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials* v.29, p.3451–3460, 2008.

INJAC, R; PERSE, M; CERNE, M; NEJCA, P; Radic, N; Govedarica, B; Djordjevic, A; Cerar, A; Strukelj, B. Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer *Biomaterials*, v. 30, p. 1184–1196, 2009.

JACOBSON, DA. Novel therapeutics for the treatment of graft-versus-host disease. *Expert Opin Investig Drugs*, v.11, n.9, p.1271-80, 2002.

JAKSCH, M; MATTSSON, J. The pathophysiology of graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*, v.61, p.398-409, 2005.

JOHNSON, BD; BECKER, EE; TRUITT, RL. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol. Blood Marrow Transplant*.v. 5: 123–132, 1999.

KIM, BK; CHUNG, KW; SUN, HS; SUSH, JG; MIN, WS; KANG, CS; SIM, SI; SHIN, WS, LIM, CC. Liver disease during the first post-transplant year in bone marrow transplantation recipients: retrospective study. *Bone Marrow Transplant*, v.26, p.193–197, 2000.

KITTAN, NA; HILDELBRANDT, GC. The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft-versus-host disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. v. 341, p.97-120, 2010.

KOLB, HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, v.112, p.4371-4379, 2008.

KOHEN, R; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, v.30, p.620–650, 2002.

KRENGER, W; HILL, GR; FERRARA, JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, v.27, n.64, p.553-8, 1997.

KROTO, HW; HEATH, JR; O'BRIEN, SC; CURL, RS; SMALLEY, RE. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature*, v. 318, p.162 – 163, 1985.

KRUSIC, PJ; WASSERMAN, E; KEIZER, PN; MORTON, JR; PRESTON, KF. Radical Reactions of C₆₀, *Science*, v.254, p. 1183-1185, 1991.

KUMAR, A; MENON, SK. Fullerene derivatized s-triazine analogues as antimicrobial agentes. *European Journal of medicinal Chemistry*, vol. 44, n. 5, p.2178-2183, 2009.

LAI, YL; CHIANG, LY. Water-soluble fullerene derivatives attenuate exsanguination-induced bronchoconstriction of guinea pigs. *J. Auton.Pharmacol*, v. 17, p. 229–235, 1997.

LEBINE JE. Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. v. 93, n.5, p.571-7, 2011.

LIU, L; PURI, KD; PENNINGER, JM; KUBES, P. Leukocyte phosphoinositide 3-kinase gamma and phosphoinositide 3-kinase delta have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo. *Blood*. v.15 n.4, p.1191-8, 2008.

LU, SX; HOLLAND, AM; TERWEY, TH; ALPDOGAN, O; BAUTISTA, JL; SMITH, OM; SUH, D; KING, C; KOCHMAN, A; HUBBARD, VM; RAO, UK; YIM, N; LIU, C; LAGA, AC; MURPHY, G; JENQ, RR; ZAKRZEWSKI, JL, PENACK, O; DYKSTRA, L; BAMPOE, K; PEREZ, L; FURIE, B; FURIE, B; VAN DEN BRINK, MR. Absence of P-selectin in recipients of allogeneic bone marrow transplantation ameliorates experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* v.185, n.3, p.1912-9, 2010.

MAPARA, MY; LENG, C; KIM, Y; BRONSON, R; LOKSHIN, A; LUSTER, A; SYKES, M. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHD. *Biology of blood and marrow transplantation*, n.12, p. 623-634, 2006.

MARTELLI, M; GUERLINZONI, F; DE RENZO, A; ZINZANI, LP; DE VIVO, A; CANTONETTI, M; FALINI, B; STORI, S; MELONI, G; RIZZO, M; MOLINARI, LA; LAURIA, F; LAUTA, MV; MAZZA, P; GUARDIGNI, L; PESCARMONA, E; PILERI, SA; MANDELLI, F; TURA, S. Early autologous stem-cell transplantation versus conventional chemotherapy as front-line therapy in high-risk, aggressive non-Hodgkin lymphoma: An Italian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. V. 21, n.7, p.1255-62, 2003.

MASHINO, T; OKUDA, K; HIROTA, T; HIROBE, M; NAGANO, T; MOCHIZUCHI, M. Inhibition of E. coli Growth by Fullerene Derivatives and Inhibition Mechanism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.9, p. 2959-2962, 1999.

MURAI, M; YONEYAMA, H; HARADA, A; VESTERGAARD, C; GUO, B; SUZUKI, K; ASAKURA, H; MATSUSHIMA, K. Active participation of CCR5(+) CD8(+)T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, v.57, p. 104:49, 2003.

QUICK, KL; ALI, SS; ARCH, R; XIONG, C; WOZNIAK, D; DUGAN, LL. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol Aging* , v.29, p.117–28, 2008.

RHODEN, E; PEREIRA-LIMA, L; LUCAS, M; MAURI, M; RHODEN, C; PEREIRA-LIMA, JC; ZETTLER, C; PETTEFFI, L; BELLO-KLEIN, A. The effects of

allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion:experimental study in rats. *Eur Surg Res*, v.32, p.215-222, 2000.

REUTER, S; GUPTA, SC; CHATURVEDI MM; AGGARWA, BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* v. 49, p. 1603–1616, 2010.

RUBIN H. Cancer cachexia: its correlations and causes. *Proc Natl Acad Sci* , v. 100, n.9, p.5384-9, 2003.

SAAD, SY; NAJJAR, TA; AL-RIKABI, AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacological Research*, v. 43, n. 3, p. 211-218, 2001.

SERODY, JS; BURKETT S.E., PANOSKALTSIS-MORTARI A., NG-CASHIN J., MCMAHON E., MATSUSHIMA G.R., LIRA S.A., COOK D.N., BLAZAR B.R. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to recruitment of CD8+ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood.*, V.96, 2973-2980, 2000.

SILVA, G. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nature Reviews. Neuroscience*, v.7, p. 65-74, 2006.

SUEKI, K; AKIYAMA, K; ZHAO, YL; ITO,I; OHKUBO,Y; KIKUCHI, K; KATADA, H; NAKAHAR, M. Systematic Study of Lanthanoid Endohedral Metallofullerenes: Production Yields, HPLC Retention Time and Reactor Irradiation Effects. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 256, p.159-162, 2003.

TANG, JI; ASHCROFT, JM; CHEN, D; MIN, G; KIM, CH; MURKHEJEE, M; LARABELL, C; KEASLING, JD. Charge-Associated Effects of Fullerene Derivatives on Microbial Structural Integrity and Central Metabolism. Chen, FF. *Nano letters*, vol.7 n.4, p.754-760, 2007.

TERWEY, TH; KIM, TD; KOCHMAN, AA; HUBBARD, VM; LU, S; ZAKRZEWSKI, JL. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*, v.106, p.3322–3330, 2005.

THRASH, TP; CAGLE, DW; ALFORD, JM; WRIGHT, K; EHRHARDT, GJ; MIRZADEH, S; WILSON,LJ. TOWARD. Fullerene-Based Radiopharmaceuticals: High Yield Neutron Activation of Endohedral ¹⁶⁵Ho Metallofullerenes, *Chem. Phys. Lett.* V. 308, p.329-336, 1999.

TISDALE MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, v.2, n.11, p. 862-71, 2002.

TSAI, MC; YH, CHEN; LY CHIANG. Polyhydroxylated C₆₀, Fullerenol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-elicited Changes in Rat Hippocampus In-vitro. *JPharm Pharmacol*, v.49, n.4, p.438-445, 1997.

TSCHETTER, JR; MOZES, E; SHEARER, GM. Progression from acute to chronic disease in murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J. Immunol*, v.165, p. 5987-5994, 2000.

URSO, ML; CLARKSON, PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, v.189, p.41-54, 2003.

VILENO, B; SIENKIEWICZ, A; LEKKA, M; KULIK, AJ; FORRÓ, L. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60. *Carbon*, v.42, p.1195-1198, 2004.

VODANOVIC-JANKOVIC, S; HARI, P; JACOBS, P; KOMOROWSKI, R; DROBYSKI, W. NF-Kb as target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. *Blood*, v. 107, n.2, p. 827-34, 2006.

WILL, A; WYNN, R. Diagnosis of acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, v.81, p.505-506, 2006.

WYSOCKI, CA; PANOSKALSIS-MORTARI, A; BLAZAR, BR; SERODY, JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, v.105, p. 4191-4199, 2005.

YAGMURCA, M; BAS, O; MOLLAOGLU, H; SAHIN, O; NACAR, A; KARAMAN, O; SONGUR, A. Protective Effects of Erdosteine on Doxorubicin-induced Hepatotoxicity in Rats. *Archives of Medical Research*, v. 38, p. 380-385, 2007.

YAMAKOSHI, Y; UMEZAWA, N; RYU, A; ARAKANE, K; MIYATA, N; GODA, Y. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (c60) as potential medicines: O2- versus 1o2. *J Am Chem Soc*, v.125, p.12803-9, 2003.

YUDOH. KAZUO; KARASAWA, R; MASUK, K; KATO, TOMOHIRO. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. *International Journal of Nanomedicine*, v.4, p.217-225, 2009.

ZHU, Z; SCHUSTER, D.I; TUCKERMAN, ME. Molecular dynamics study of the connection between flap-closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease. *Biochemistry (Mosc)*.v. 42, p. 1326-1333, 2003.