

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

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2016

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

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Priscila Teles de Tolêdo Bernardes

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva - *Professora
Associada do Departamento de Morfologia-ICB/UFMG.*

Co-orientadora: Profa. Dra. Marina Gomes Miranda e Castor

Romero – *Professora Adjunta do Departamento de Farmacologia-
ICB/UFMG*

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho a Deus, minha fortaleza e fonte de luz.

Aos meus pais, meus maiores exemplos, pelo conforto, admiração e amor
incondicional.

Ao meu marido, Thiago Souza, por me ensinar o significado do amor e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

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

À professora, Vanessa Pinho, pelo respeito, acolhida e por me orientar ao longo de toda a jornada.

À minha co-orientadora, Marina Castor, pela paciência, atenção e direcionamento ao longo de todo o período em que estive na UFMG.

Aos companheiros de laboratório pelos conselhos, apoio e torcida. Em especial, agradeço imensamente à Bárbara (Bela), Carolzinha, Rayssa, Thiago Àvila e Lízia, pela troca de ideias e momentos de bancada.

Ao professor Mauro Teixeira pelos ensinamentos e a todos os companheiros do grupo Imunofarmacologia, em especial à Ilma e Frank pela atenção e ajuda.

À professora Denise Carmona pela disponibilidade e carinho com que me atendeu em todas as vezes que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, e a todos os professores, pelos ensinamentos recebidos. Em especial, agradeço aos professores Glayds, Aristóbolo e Juliana pelas orientações durante o Programa Reuni.

Aos colaboradores do CDTN, pela colaboração neste trabalho.

À todos os meus queridos alunos por tornar a minha caminhada mais leve e feliz.

Aos amigos Albená e Janaína Nunes pela generosidade e apoio.

À minha amiga Fernanda por me escutar e amparar nos momentos de “desesperos”.

Aos meus pais, Jorge e Sônia, por me mostrar o caminho do bem, por me ensinarem e incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e principalmente pelo exemplo de família e união. Sem vocês nada seria possível!

Ao meu irmão Cláudio, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida e por me mostrar o quão forte posso ser.

Às minhas avós, Amitair e Lourdes (in memória) pelo colo e cuidados.

À minha cunhada Lidiane Souza e aos meus sogros (Haidê e Júlio) por me receberem com tanto carinho e como membro da família.

Ao meu marido, Thiago Souza, por me dar a mão e caminhar lado a lado comigo. Por enxugar minhas lágrimas, por me fazer sorrir, pelo silêncio tão acolhedor e pelas palavras de entusiasmo, otimismo e principalmente pelo amor sincero.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1) INTRODUÇÃO	15
1.1) DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO OU GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD)	15
1.2) ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	19
2) JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	24
3) OBJETIVOS	25
3.1) OBJETIVO GERAL	25
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	25
4) MATERIAL E MÉTODOS:	26
4.1) ANIMAIS	26
4.2) INDUÇÃO DA DOENÇA DO ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD) AGUDA.....	26
4.3) TRATAMENTO UTILIZADO	27
4.4) ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO:	28
- ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA:	29
4.5) ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	30
4.6) QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS	34
4.7) ANÁLISE DO ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO TECIDO HEPÁTICO E INTESTINAL	34
4.8) ANÁLISE DO RECRUTAMENTO CELULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	35
4.9) ANÁLISE DO PERFIL CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO:.....	35
4.10) AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E DA SOBREVIVÊNCIA	36
4.11) AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO ENXERTO CONTRA O TUMOR (GRAFT VERSUS TUMOR OU GVT)	38
4.12) ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5) RESULTADOS	39
5.1) PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA GVHD.....	39
5.2) EFEITOS DO AUMENTO DE ROS E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD	42
5.3) EFEITOS DO AUMENTO DE ROS E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESENCADEADA NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD	50
5.4) EFEITOS DO AUMENTO DE ROS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ÓRGÃOS LINFÓIDES DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.....	59
5.5) EFEITOS DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NADPH OXIDASE SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS SINAIS CLÍNICOS E SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS COM GVHD.....	62
5.6) EFEITOS DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO NA ATIVIDADE DO COMPLEXO DA NADPH OXIDASE SOBRE A RESPOSTA DO ENXERTO-VERSUS-TUMOR (GVT)	63
5.7) EFEITOS DA APOCININA SOBRE A RECONSTITUIÇÃO DA MEDULA (“PEGA DO ENXERTO”).....	64
DISCUSSÃO	67

CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO 1	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AS TRÊS FASES DO MODELO DE GVHD AGUDA. A FASE 1 É DESENCADEADA PELO REGIME DE CONDICIONAMENTO.	18
FIGURA 2. ATIVAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH-OXIDASE.	21
FIGURA 3 – INDUÇÃO DA GVHD	28
FIGURA 4. PREPARAÇÃO DOS INTESTINOS PARA CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS EM FORMA DE ROCAMBOLE.....	31
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DOS CRITÉRIOS AVALIADOS PELA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO.	33
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DOS CRITÉRIOS AVALIADOS PELA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO.	33
FIGURA 7 – AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ÓRGÃOS ALVO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	39
FIGURA 8 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO E NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM GVHD.	41
FIGURA 9 – TRATAMENTO COM APOCININA REDUZIU A GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS COM GVHD.....	43
FIGURA 10. ACÚMULO DE CÉLULAS TCD4 ⁺ E TCD8 ⁺ NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	44
FIGURA 11. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	46
FIGURA 12. TRATAMENTO COM APOCININA NÃO INFLUENCIOU O ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	48
FIGURA 13. TRATAMENTO COM A APOCININA REDUZIU OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.....	49
FIGURA 14 – TRATAMENTO COM APOCININA REDUZIU GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM GVHD..	51
FIGURA 15. TRATAMENTO COM APOCININA RESULTOU EM MENOR ROLAMENTO E ADEÇÃO DE LEUCÓCITOS NAS VÊNULAS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.....	52
FIGURA 16. ACÚMULO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E T CD8 ⁺ NO INTESTINO (JEJUNO ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	53
FIGURA 17. ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO INTESTINO (JEJUNO-ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD..	55
FIGURA 18. ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO INTESTINO (JEJUNO-ILEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	57
FIGURA 19. TRATAMENTO COM A APOCININA REDUZIU OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO INTESTINO (JEJUNO-ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD..	58
FIGURA 20. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE LINFÓCITOS CD8 ⁺ NO BAÇO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD.	60
FIGURA 21. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO BAÇO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD..	61
FIGURA 22. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NADPH-OXIDASE, ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM APOCININA, DIMINUIU OS SINAIS CLÍNICOS E A TAXA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS COM GVHD.....	63
FIGURA 23. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NADPH-OXIDASE EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD NÃO INTERFERE NA RESPOSTA DO ENXERTO-VERSUS-TUMOR.....	64
FIGURA 24. RECONSTITUIÇÃO E QUIMERISMO EM CAMUNDONGOS COM GVHD.	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESCALA CLÍNICA	37
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: célula apresentadora de antígenos

ATB: antibiótico

BSA: albumina bovina

CAT: catalase

Co⁶⁰: cobalto 60

DCF: 2', 7' - diclorofluoresceína

DCF-DA: 2', 7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato

GSH: glutationa peroxidase reduzida

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

i.v: intravenoso

i.p: intraperitoneal

IFN- γ : Interferon gama

LPS: lipopolissacarídeos

MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos

MDA: malonaldeído

MHC: complexo de histocompatibilidade maior

MiHag: antígenos de histocompatibilidade menor

MPO: mieloperoxidase

MRI: imagem de ressonância magnética

NADH-oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - oxidase

NAG: n-acetilglicosaminidase

NK: células natural killer

NF-kB: fator nuclear kappa B

O₂⁻: ânion superóxido

OH⁻: radical hidroxila

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: tampão de salina fosfatado

PHOX: oxidase de fagócitos

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOD: superóxido dismutase

TCH: transplante de células hematopoiéticas

TCAE: enzima conversora de TNF- α

TBARS: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TNFR1: receptor do fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

Introdução: A doença do enxerto contra hospedeiro (graft versus host disease - GVHD) é uma doença secundária ao transplante de células hematopoiéticas (TCH), 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, podendo levar à morte do paciente. Ela está associada à resposta inflamatória exacerbada com liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). No presente estudo avaliamos o papel de ROS na patogênese da GVHD. **Métodos:** A GVHD foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos e de 1×10^7 células da medula óssea de camundongos doadores semiallogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1 irradiados com dose de 9 Gy. Para avaliar o papel de ROS na GVHD, camundongos submetidos à doença foram tratados com apocinina (grupo APO), um inibidor da translocação intracelular de componentes citossólicos do complexo NADPH-oxidase, na dosagem de 3 mg/kg/dia por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do transplante até o final do experimento. Camundongos que receberam esplenócitos + células medulares de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e constituíram o grupo controle. Os níveis de ROS foram analisados no baço, medula óssea, fígado e intestino em duas fases do desenvolvimento da doença: início dos sinais clínicos e da mortalidade, aproximadamente 6 e 13 dias após o transplante, respectivamente. A resposta inflamatória foi avaliada por análise: do estresse oxidativo (mensuração de superóxido dismutase, catalase e peroxidação lipídica), de níveis de citocinas e quimiocinas, por ELISA, da quantificação indireta de macrófagos pela atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG) e neutrófilos pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de parâmetros histopatológicos, do recrutamento, adesão e acúmulo de leucócitos através de microscopia intravital ou citometria de fluxo. A sobrevivência e os sinais clínicos foram acompanhados durante o desenvolvimento da doença. O efeito do enxerto em eliminar o tumor (GVT) também foi analisado. **Resultados:** Verificou-se maiores níveis de ROS no baço e medula óssea (início dos sinais) em camundongos com GVHD. No início da mortalidade este grupo apresentou aumento de ROS no baço e fígado. O tratamento com apocinina diminuiu os níveis de ROS nestes órgãos. Concomitantemente, verificou-se uma redução significativa de TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico), bem como diminuição nos níveis de IFN-gama, TNF-alfa, IL-17, CCL2, CCL3, CCL5, acúmulo de macrófagos associados a menores parâmetros histopatológicos no fígado e no intestino em camundongos submetidos à GVHD tratados com apocinina. O bloqueio da NADPH-oxidase foi associado à diminuição do rolamento e adesão de leucócitos no intestino. Além disso, o tratamento com apocinina levou a um menor acúmulo de células T CD4⁺ e CD8⁺ e de macrófagos em órgãos analisados. Observou-se uma redução na mortalidade (70%) e uma menor incidência e severidade das pontuações clínicas da doença em camundongos com GVHD tratados com apocinina. Verificou-se ainda que a apocinina não alterou o efeito benéfico do GVT. **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que as ROS desempenham um papel pró-inflamatório levando a uma amplificação e não resolução na GVHD e que a redução em seus níveis pode ser uma estratégia importante no controle desta patogenia.

ABSTRACT

Introduction: 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 disease is associated with increased inflammatory response through the release of inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and reactive oxygen species (ROS). Here, we evaluate the role of ROS in the GVHD pathogenesis. **Methods:** GVHD was induced by the transplant of 1×10^7 bone marrow cells + 3×10^7 splenocytes from C57BL/6 mice (GVHD group). The control group received isogenic cells from B6D2F1 mice. To assess the role of ROS in the pathogenesis of GVHD, mice subject to GVHD were treated with apocynin (APO group), an inhibitor of the intracellular translocation of cytosolic components of the NADPH-oxidase complex, using 3mg/Kg every day. The levels of ROS were analyzed in spleen, bone marrow, liver and intestine following phases of development of clinical disease: onset of clinical disease (day 6) and mortality (day 13). The inflammatory response was assessed by analysis of oxidative stress (superoxide t dismutase, catalase and lipid peroxidation), the levels of cytokines and chemokines by ELISA, indirect quantification of macrophages by N-acetylglucosaminidase activity (NAG), histopathological parameters, recruitment, adhesion and accumulation of leukocytes by intravital microscopy or flow cytometry in the early mortality of GVHD. We also investigated the accumulation of inflammatory cells in lymphoid organs by flow cytometry onset mortality. The survival and clinical score of disease were evaluated. **Results:** Levels of ROS were increased in target organs of GVHD mice and reduced in apocynin-treated mice at day 6 and spleen and bone marrow and at day 13 in the liver. We verified a reduction of TBARS, in levels of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-17, CCL2, CCL3, CCL5, accumulation of macrophage associated a less histopathology parameters in liver and intestine of mice treated with apocynin. Mechanistically, pharmacological blockade of the NADPH-oxidase was associated with decreased rolling and adhesion of leukocytes to the mesenteric microcirculation, as assessed by intravital microscopy. Moreover, the experiments showed that apocynin-treatment reduced the CD4⁺, CD8⁺ cells and macrophage accumulation in organs. The pharmacological blockade of NADPH oxidase resulted in reduced mortality (70%) and less incidence and severity of clinical scores of GVHD. We also observed that the treatment with apocynin did not alter the beneficial effect of graft-versus-tumor **Conclusion:** Our study demonstrates that ROS plays an important role in mediating GVHD. We suggest that strategies aimed at blocking the ROS production should be evaluated further for their usefulness as an adjuvant treatment in patients undergoing bone marrow transplant.

1) INTRODUÇÃO

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

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) tem sido um tratamento de escolha amplamente utilizado para várias doenças hematológicas, neoplásicas e congênitas, tais como: leucemia, linfomas, anemia aplásica, anemia falciforme e de Blackfan-Diamond, talassemias, mieloma múltiplo e deficiências imunes (FERRARA e cols., 2009; CHEUK, 2013). Existem basicamente três tipos de TCH: o autólogo, no qual o doador é o próprio paciente, o alogênico, no qual o doador é alguém compatível geneticamente (compatibilidade do sistema HLA - antígenos de histocompatibilidade principal) com o paciente, podendo ser um parente ou alguém não relacionado, e o singênico, que ocorre entre irmãos gêmeos (JAGASIA e cols., 2012). Mais de vinte e cinco mil transplantes alogênicos de células hematopoiéticas são realizados anualmente em todo o mundo (CHOI e cols., 2010). Entretanto, somente 25% a 30% dos pacientes têm na família um doador que seja compatível geneticamente para este tipo de transplante (CHOI e cols., 2010). Dessa maneira, o acesso a esta forma de terapia tem sido limitado à disponibilidade de doadores HLA compatíveis e, também, a uma doença secundária ao transplante, denominada doença do enxerto contra hospedeiro (ou no inglês, Graft-versus-Host Disease – GVHD) (FERRARA e cols., 2009; HOLTANI e cols., 2014).

A GVHD é uma doença inflamatória sistêmica relatada pela primeira vez em 1962 (BARNES e cols., 1962). Ela ocorre quando os linfócitos T contidos nas células transplantadas reconhecem disparidades antigênicas entre os indivíduos doadores e os receptores, provocando uma resposta imunológica em diversos órgãos, tais como pele, fígado, pulmões, intestino e órgãos linfóides (BALL & EGELER, 2008; FERRARA, 2009; CASTOR e cols., 2011; ROBB & HILL, 2012). Esta doença pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. Na GVHD aguda, os primeiros sinais e sintomas ocorrem em um período menor que cem dias, geralmente entre duas a seis semanas após o transplante, e são caracterizados por lesões dos órgãos alvo, tais como intestino, fígado, pulmões e pele, e também pela presença de diarreia, vômitos, erupções cutâneas e disfunção hepática (FERRARA e cols., 2009). Estima-se que 40% dos pacientes que passam por um TCH alogênico com um doador geneticamente compatível desenvolvem GVHD aguda e que de 15% a 40% destes morrem devido a esta doença (JAGASI e cols., 2012). Entretanto, quando

os TCH ocorrem utilizando células de doadores não compatíveis, a chance de desenvolvimento de GVHD aguda aumenta para 80% (PETERSDORF, 2013). Quando os sinais aparecem em um período maior que cem dias após o transplante, a GVHD é caracterizada como uma doença inflamatória crônica e é semelhante a uma doença autoimune, caracterizada por atrofia de órgãos e alterações hepáticas semelhantes a uma esclerose biliar (SHLOMCHIK, 2007, PIDALA e cols., 2014). Devido a seu alto índice de morbidade e mortalidade, considera-se a GVHD (aguda ou crônica) como a principal limitação do TCH na clínica, principalmente o alogênico.

A etiologia da GVHD é bastante complexa, sendo que sua prevalência e gravidade podem variar de acordo com o grau de histocompatibilidade entre receptor e doador (diferença entre os antígenos de histocompatibilidade principal e menor – HLA e miHag, respectivamente) (FERRARA e cols., 2009, PETERSDORF, 2013, SPIERINGS e cols., 2013). Diferença no miHag entre mulher e homem e a idade entre doadores e receptores são variáveis importantes no desencadeamento desta doença. Aproximadamente 20% dos indivíduos com até vinte anos que são submetidos ao TCH alogênico desenvolvem GVHD aguda enquanto que indivíduos com mais de cinquenta anos de idade têm 80% de chance de desenvolvê-la (FERRARA e cols., 2007). A fonte do enxerto hematopoiético também pode favorecer a ocorrência da GVHD (FERRARA e cols., 2009, BLAZAR e cols., 2012). A utilização de células do cordão umbilical para o transplante que são imaturas e, portanto, menos funcionais, estão associadas a uma menor prevalência do desenvolvimento da doença quando comparado com células tronco purificadas do sangue (FERRARA e cols., 2007, BLAZAR e cols., 2012). Outro fator importante é o regime de condicionamento do indivíduo receptor. Este procedimento ocorre antes do transplante, utilizando-se radioterapia e/ou quimioterapia e é importante para eliminar as células tumorais da doença de base e diminuir a rejeição do enxerto (KITTAN & HILDELBRANDT, 2010). Entretanto, o regime de condicionamento leva também à destruição dos tecidos do paciente e à consequente liberação de mediadores inflamatórios que desempenham um papel importante no desencadeamento ou facilitação da ocorrência da GVHD após o TCH (BLAZAR e cols., 2012).

A fisiopatologia da GVHD aguda pode ser descrita em 3 fases (Figura 1). A fase inicial é provocada pelo regime de condicionamento que leva à lesão e ativação das células do hospedeiro, especialmente a mucosa intestinal do TGI. Nesta fase, células apresentadoras de antígenos (APCs) do indivíduo receptor são ativadas aumentando a expressão de

moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e de moléculas de adesão (FERRARA e cols., 2009; HARRIS e cols., 2013; HOLTANI e cols., 2014). Os danos teciduais no trato gastrointestinal (TGI) resultante do regime de condicionamento são particularmente importantes neste processo, pois permitem a translocação de bactérias e a liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), estimulando a secreção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) dos tecidos do hospedeiro, principalmente dos macrófagos que aumentam ainda mais a ativação de APCs e outras células do sistema imune, amplificando o processo inflamatório (PACZESNY e cols., 2010; BLAZAR e cols., 2012). A segunda fase da GVHD ocorre após o transplante e caracteriza-se pela interação das células T CD4+ e CD8+ doadas com as APCs do indivíduo receptor levando à proliferação, ativação e diferenciação destas células T em células T citotóxicas efetoras. Essas células ativadas migram para os tecidos dos órgãos que foram anteriormente lesados pelo condicionamento, chamados neste contexto de órgãos alvo da doença (principalmente o intestino, fígado, pulmões, órgãos linfoides e pele) (FERRARA e cols., 2009; BLAZAR e cols., 2012; HARRIS e cols., 2013). Finalmente, a terceira fase, também denominada fase efetora, consiste na destruição destes órgãos pelas células T que além de desempenharem sua função citotóxica, liberam mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas inflamatórias, que recrutam e ativam células efetoras, incluindo linfócitos, macrófagos, e células "natural killer" (NK), que atacam os tecidos do hospedeiro. Essa fase final pode levar o indivíduo (receptor) à morte, pois pode resultar num quadro de sepse e em uma resposta inflamatória sistêmica (PACZESNY e cols., 2010, BLAZAR e cols., 2012).

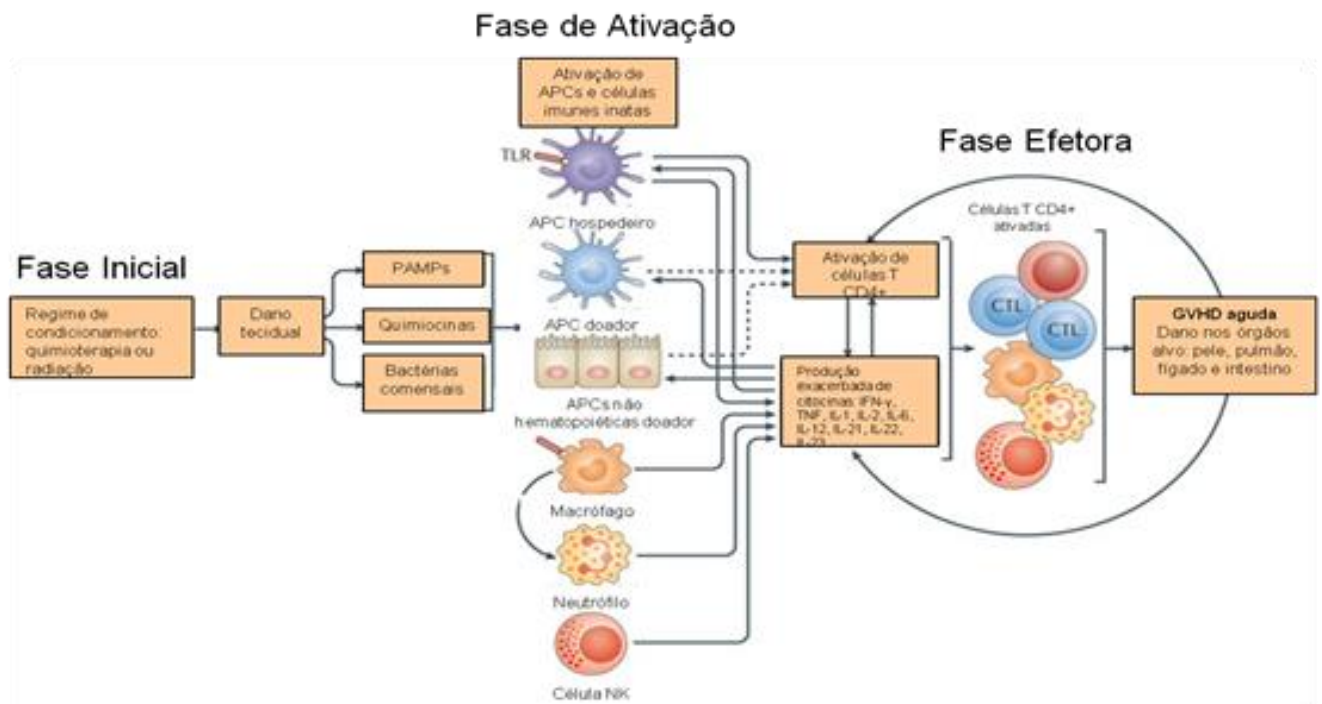


FIGURA 1 - AS TRÊS FASES DO MODELO DE GVHD AGUDA. A FASE 1 É DESENCADEADA PELO REGIME DE CONDICIONAMENTO. NA FASE 2 ONDE OCORRE A ATIVAÇÃO DA CÉLULA T, A PARTIR DA SUA INTERAÇÃO COM A APC E NA FASE 3 A CÉLULA T MIGRA PARA OS ÓRGÃOS ALVO E JUNTO À APC ESTIMULAM UMA RESPOSTA EFETORA NESTES TECIDOS (FIGURA ADAPTADA DE BLAZAR E COLS., 2012).

Em todas as três fases da GVHD observa-se uma produção exacerbada de quimiocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o recrutamento e ativação celular. No intestino e fígado, observa-se um aumento nos níveis de CXCL9, CXL10, CXL11, CXL16, CCL2, CCL3 e CCL5 (como revisto por CASTOR e cols., 2012). As quimiocinas da subfamília CC, principalmente CCL2, CCL3 e CCL5, têm sido descritas como importantes para a migração de células em órgãos-alvo durante o desenvolvimento de GVHD (TERWEY e cols., 2005; CASTOR e cols., 2010, 2012a ou b, REZENDE e cols., 2014; BERNARDES e cols., 2015). Embora, o papel de CCL2 na GVHD ainda não tenha sido totalmente esclarecido, sabe-se que esta quimiocina participa na migração de leucócitos, principalmente de linfócitos CD8⁺ para o fígado e intestino. A migração e ativação destas células contribuem para o dano tecidual, uma vez que estes linfócitos T citotóxicos induzem o recrutamento de outras células efetoras que produzem mais mediadores inflamatórios, contribuindo para a perpetuação da GVHD, podendo levar a morte do indivíduo (BLAZAR e cols., 2012). A contribuição de CCL3 na GVHD vêm sendo demonstrada através de trabalhos com camundongos deficientes nesta quimiocina ou bloqueadores farmacológicos. Estes estudos comprovaram que a redução nos níveis de CCL3 pode ser uma estratégia importante para o controle da GVHD, uma vez que

sua redução esteve associada a menores taxas de mortalidade e morbidade em camundongos que desenvolveram a doença (CASTOR e cols., 2010). O aumento nos níveis de CCL5 e na expressão de seu receptor (CCR5) tem sido atribuído ao agravamento da lesão de pele observada em pacientes com GVHD, uma vez que eles promovem um recrutamento de linfócitos T, além de contribuir para a produção e liberação de TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL-2, e de IFN- γ (interferon-gamma) que participam na patogênese de GVHD humana (PALMER e cols., 2010).

A ativação e recrutamento de leucócitos para órgãos alvos, característica da fase efetora, é um passo importante para o agravamento da GVHD. Neste processo, os leucócitos principalmente fagócitos, quando ativados levam a liberação de diferentes moléculas pró-inflamatórias, dentre elas, as espécies reativas de oxigênio (do acrônimo ROS: *reactive oxygen species*) que estão relacionadas a uma explosão oxidativa (“burst oxidativo”) sendo importantes mediadores de lesão tecidual em diferentes doenças inflamatórias (FERRARA e cols., 2009, SUH e cols., 2014). Entretanto, ainda não foi demonstrado a importância de ROS para a fisiopatologia da GVHD.

Embora a inflamação exacerbada observada na fisiopatologia da GVHD seja o principal complicador no controle da doença, levando a altos índices de mortalidade, sabe-se que a doença do enxerto pode contribuir para eliminar as células tumorais remanescentes no hospedeiro, ocasionando uma resposta benéfica denominada de enxerto versus tumor (GVT) ou enxerto versus leucemia (GVL) (LI e cols., 2009). Esta é uma das limitações de alguns tratamentos de prevenção e de cura da GVHD, uma vez que muitos interferem no efeito contra o tumor (MATEJKOVA e cols., 2008; Li e cols., 2009). Desta maneira, tratamentos que visam o controle da GVHD sem afetar a resposta da GVT tem extrema relevância clínica.

1.2) Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Consideram-se espécies reativas de oxigênio, moléculas que contenham um oxigênio em um estado altamente reativo e, portanto, com uma grande capacidade oxidativa. Elas incluem as espécies radicais, tais como: ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxila (OH^{\cdot}), peróxila (RO_2^{\cdot}), alcóxila (RO^{\cdot}), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e também moléculas não radicais, ou seja, que não contém elétrons desemparelhados na sua última camada, mas que são bastante

reativas, tais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete (1O_2) (BEDARD; KRAUSE, 2007). Estas moléculas são produzidas em níveis fisiológicos no organismo através do metabolismo aeróbico (respiração celular). Sob condições normais na cadeia respiratória mitocondrial, cerca de 95 a 98% do oxigênio (O_2) consumido sofre redução e formam água. Entretanto, 2 a 5% do O_2 são reduzidos univalentemente, recebendo apenas um elétron, o qual ocupa um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados espécies reativas de oxigênio. A partir desta primeira etapa, forma-se a primeira espécie reativa de oxigênio radicalar, denominada ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Em meio aquoso este radical dará origem a uma molécula não radicalar denominada peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por meio de uma reação conhecida como Haber-Weiss, catalisada por íons de ferro, o ânion superóxido auxilia na produção de outra espécie radicalar: hidroxila (OH^{\cdot}). A partir destes intermediários, e sob a ação de algumas enzimas, são gerados outros intermediários reativos, tais como oxigênio singlete (1O_2) e óxido nítrico (NO^{\cdot}) (VALKO e cols., 2007, GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012). Além do processo de respiração celular, as ROS podem ser produzidas pela xantina oxidase e pelo complexo proteico denominado NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase. A xantina oxidase é uma flavoproteína que catalisa a conversão da hipoxantina em xantina. Esta via é ativada no catabolismo de purinas para formação de ácido úrico (WALLWORK e cols., 2003).

O complexo da NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases) é constituído por um grupo de enzimas transmembranas presentes principalmente em células de origem mesodérmica e é composto de seis subunidades enzimáticas: duas proteínas ancoradas à membrana celular (*p22phox* e *gp91phox/NOX2*; esta última codificada pelo gene *CYBB*) que formam o flavocitocromo b558, três subunidades (*p47phox*, *p67phox*, *p40phox*) e uma GTPase (*Rac1* ou *Rac2*) localizadas no citoplasma. Quando em repouso, estes dois grupos enzimáticos (transmembrânico e citossólico) ficam separados, garantindo assim a regulação deste complexo. A ativação da célula leva a fosforilação da subunidade *p40phox* e conseqüente translocação dos componentes citossólicos, que se agregam ao complexo b558 localizado na membrana celular, conforme evidenciado na figura 2. Esta agregação permite a catalisação de elétrons através da membrana celular para o oxigênio molecular, gerando ânion superóxido e, em seguida, outras espécies reativas de oxigênio (BEDARD e cols., 2007). Este complexo enzimático foi originalmente descoberto em neutrófilos (DWORAKOWSKI e cols., 2006). Atualmente, consideram-se seis homólogos da

gp91phox/NOX2 localizados em células não fagocíticas e denominados NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 (NADPH oxidase 1, 2, 3, 4 e 5), DUOX1 e DUOX2. De acordo com esta terminologia, a gp91phox é denominada NOX2 e serviu de protótipo para seus homólogos (BEDARD; KRAUSE, 2007).

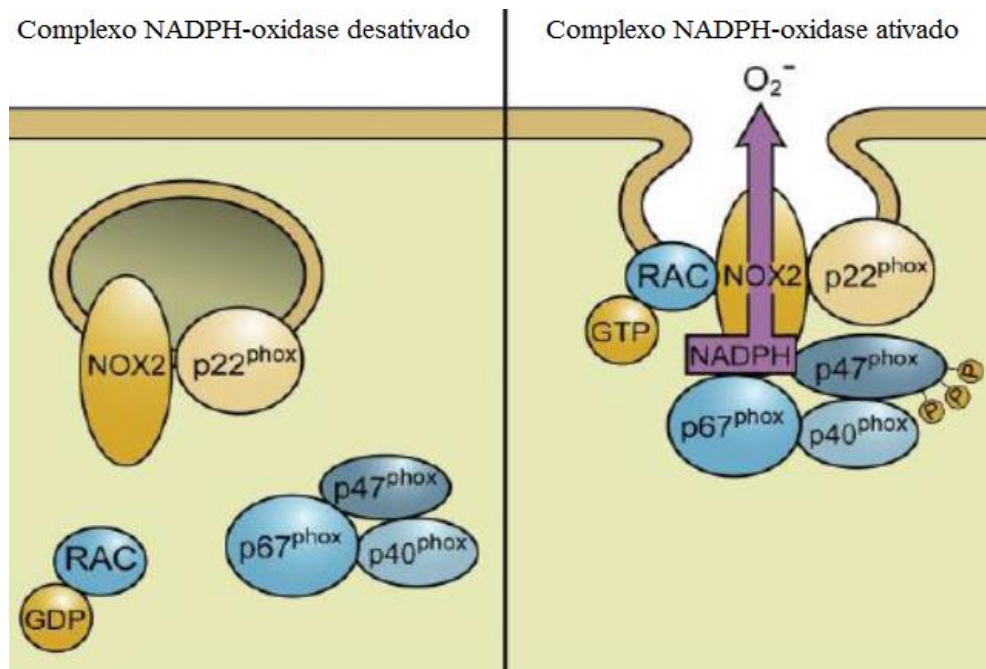


FIGURA 2. ATIVAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO NADPH-OXIDASE (ADAPTADO DE BEDARD E COLS., 2007). O COMPLEXO DA NADPH-OXIDASE É CONSTITUÍDO É COMPOSTO DE SEIS SUBUNIDADES ENZIMÁTICAS: DUAS PROTEÍNAS ANCORADAS À MEMBRANA CELULAR (P22PHOX E GP91PHOX/NOX2), TRÊS SUBUNIDADES (P47PHOX, P67PHOX, P40PHOX) E UMA GTPASE (RAC1 OU RAC2) LOCALIZADAS NO CITOPLASMA. EM REPOUSO, OS GRUPOS TRANSMEMBRÂNICO E CITOSSÓLICOS FICAM SEPARADOS. QUANDO ATIVADO, OCORRE A FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE P40PHOX E A TRANSLOCAÇÃO DOS COMPONENTES CITOSSÓLICOS, À MEMBRANA CELULAR.

Uma das maneiras de estudar as espécies reativas de oxigênio consiste na inativação do complexo NADPH-oxidase através do tratamento farmacológico com apocinina. A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) também conhecida como acetovanilona foi originalmente isolada das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense) por Schmiedeberg em 1883 e de uma planta nativa do Himalaia *Picrorhiza kurrooa*, muito utilizada na medicina tradicional indiana, em 1971. Em 1990, foi atribuído a esta substância a capacidade de inibir a produção de ROS através do bloqueio do complexo NADPH oxidase (SIMONS e cols., 1990; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas envolve o comprometimento da translocação dos componentes citossólicos da NADPH-oxidase para a membrana impedindo o deslocamento da subunidade

citossólica p47phox para ligar-se as subunidades do complexo localizados na membrana (p22phox e gp91phox/NOX2), interferindo de maneira efetiva na produção de ROS (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). Devido a seu baixo grau de toxicidade, a apocinina vem sendo empregada, desde então, em diversos estudos visando compreender o papel das espécies reativas de oxigênio em diferentes modelos patológicos (TANG e cols., 2007; PATERNITI e cols., 2010; LOPES e cols., 2011; NUNES e cols., 2014).

Em baixas concentrações as ROS são necessárias para processos celulares vitais (proliferação, diferenciação e adesão celular, ativação de fatores de transcrição e regulação endotelial), além de serem importantes para o controle de infecção por microrganismos (REUTER e cols., 2010, FREITAS e cols., 2010). Sabe-se, entretanto, que em altas concentrações estas moléculas podem desencadear um processo inflamatório estimulando a ativação celular em sítios inflamados, levando a liberação de citocinas e quimiocinas, e aumentando a expressão de moléculas de adesão, o que pode culminar na destruição celular e tecidual (NAIK; DIXIT, 2011; ZHANG e cols., 2011; ZHOU; SHEN; CLARET, 2013).

Os efeitos deletérios provocados pelas ROS, geralmente, são minimizados ou neutralizados pela ação das defesas antioxidantes do organismo, incluindo carotenóides, tocoferóis, ácido ascórbico e enzimas antioxidantes, representadas pela superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH) e catalase (CAT) (NAIK; DIXIT, 2011).Entretanto, durante uma resposta inflamatória intensa caracterizada por níveis aumentados de ROS, uma situação de desequilíbrio denominada estresse oxidativo pode ser evidenciada (REUTER e cols., 2010; GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012). Esta condição pode provocar oxidação da camada lipídica das membranas celulares (peroxidação lipídica) e gerar danos às proteínas e ao DNA (ácido desoxirribonucleico) (FREITAS e cols., 2010, ZHANG e cols., 2011; MORGAN; LIU, 2011, GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012; CAMPS; GARCIA-HEREDIA, 2014). Diversos mecanismos de dano celular são desencadeados pela produção aumentada de ROS e do estresse oxidativo: recrutamento celular, formação de peroxinitrito, liberação de mediadores quimiotáticos, dano endotelial, liberação de citocinas como TNF-alfa e ativação de vias pró-inflamatórias. A via do inflamassoma pode ser ativada por ROS, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18 (TSCHOPP e cols., 2010).

Existe uma associação entre o estresse oxidativo e várias doenças inflamatórias, dentre elas o Diabetes Mellitus, câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares, renais, neurodegenerativas, isquemia e reperfusão hepática, entre outras (REUTER e cols., 2010, NAIK; DIXIT, 2011, POHANKA, 2013; CAMPS; GARCIA-HEREDIA, 2014, GUGLIUCCI; MENINI, 2014). A geração de um estresse oxidativo pode ser uma das consequências do transplante alogênico de células hematopoiéticas (SABUNCUOGLU e cols, 2012, QIAN; SHEN, 2013, SUH e cols., 2014). Um estudo realizado em 2007 por Amer e colaboradores demonstrou que camundongos com GVHD apresentaram um aumento de ROS em células sanguíneas (hemácias, neutrófilos e linfócitos) e uma diminuição da expressão de glutathione oxidase, eventos característicos do estresse oxidativo. Em 2015, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as ROS estão aumentadas no fígado de camundongos submetidos à GVHD quando comparados a camundongos que não desenvolveram a doença (animais que receberam células singênicas) e que o tratamento com um nanocomposto denominado fullerol, que possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, foi eficaz em diminuir a progressão da doença e aumentar a sobrevivência dos animais. Embora existam algumas evidências que sugiram uma associação entre o aumento de ROS em células inflamatórias na GVHD, o papel destes mediadores inflamatórios no desenvolvimento da doença ainda não é bem esclarecido. Considerando a complexidade inflamatória da GVHD e os efeitos deletérios das ROS evidenciados em outros processos inflamatórios, torna-se relevante compreender o papel destas moléculas na GVHD. Diante dos altos níveis de morbidade e mortalidade desta doença, o entendimento do papel de ROS poderia ser útil para o desenvolvimento de novas terapias no controle da doença do enxerto contra hospedeiro.

2) JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Dados publicados, que foram gerados durante meu mestrado e doutorado (BERNARDES e cols., 2015) (anexo 1), mostraram que camundongos com GVHD apresentaram maiores níveis de espécies reativas de oxigênio em órgãos linfóides (baço) e fígado. O tratamento com um nanocomposto denominado fullerol, o qual possui propriedades anti-inflamatória e antioxidante (este nanocomposto funciona como uma “esponja” de ROS), foi eficaz em diminuir os níveis de ROS, além de reduzir outros parâmetros inflamatórios em órgãos-alvo: citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, acúmulo de leucócitos e menor adesão celular. A partir destes dados e com o objetivo de explorar o papel de ROS na patogênese da GVHD, o presente trabalho foi desenvolvido.

3) OBJETIVOS

3.1) *Objetivo Geral*

O objetivo principal deste estudo é compreender o papel das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento da resposta inflamatória associada à GVHD induzida em camundongos.

3.2) *Objetivos específicos:*

- Avaliar a produção de ROS em órgãos alvos da GVHD;
- Investigar se ROS interferem na patogênese da doença;
- Estudar o papel de ROS no desenvolvimento e evolução de aspectos clínicos e na sobrevivência de camundongos submetidos à GVHD;
- Avaliar se as espécies reativas de oxigênio podem modificar a resposta do enxerto-versus-tumor

4) MATERIAL E MÉTODOS:

4.1) Animais

Utilizou-se camundongos com 8 a 12 semanas de vida, isogênicos das raças C57BL/6J e (C57BL/6J x DBA/2) F1, abreviado B6D2F1, machos, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e acesso livre à água e comida. Todos os procedimentos experimentais realizados na execução deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) através do protocolo: 191/2012. Ressalta-se que no final dos procedimentos experimentais, os camundongos restantes (que não morreram em decorrência da GVHD) também foram sacrificados com uma overdose de anestésico (mistura de 37,5 mg/ml ketamina de 2.5 mg/ml xilazina, 2.5 mg/ml). Em todos os ensaios foram feitos esforços para minimizar o sofrimento dos camundongos.

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

- Irradiação total

Os camundongos receptores, B6D2F1, foram irradiados com 9Gy de radiação gama, fonte de ^{60}Co utilizando irradiador Gammacell - 220, no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. Esta irradiação foi realizada em duas doses (4,5 Gy cada) com um intervalo duas horas entre elas. No mesmo dia da irradiação os camundongos receberam 3×10^7 esplenócitos e 1×10^7 células da medula femoral de doadores parentais, C57BL/6J-WT, intravenosamente (i.v). 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), conforme figura 3. Todos os grupos experimentais receberam tratamento com antibiótico (ATB) ciprofloxacino diluído em água filtrada (70mg de ATB por litro de água filtrada ofertada na mamadeira dos camundongos). A água com o antibiótico foi trocada a cada 2 dias por 15 dias após a

irradiação para evitar doenças secundárias à imunossupressão gerada pela ablação total da medula.

- Preparação das células para o transplante

Para a realização do transplante uma suspensão de células foi preparada a partir de um “pool” de células do baço e da medula óssea. Os baços dos camundongos doadores foram retirados e desmanchados em uma placa de Petri com um auxílio de uma peneira de Nillon em 5 mL de meio cultura RPMI incompleto gelado. Para retirada das células da medula femoral, ambos os fêmures de cada camundongo foram retirados e suas extremidades cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13 x 0,38 mm para lavagem da medula com 3 ml de meio RPMI incompleto gelado. Os líquidos recolhidos de cada lavado contendo as células obtidas do baço e medula foram colocados separadamente em um tubo Falcon e centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, cada sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 10 mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Um total de 3×10^7 esplenócitos + 1×10^7 células da medula femoral foram injetadas intravenosamente (i.v) nos camundongos receptores. A injeção de células de camundongos parentais C57BL/6J em camundongos B6D2F1 leva ao desencadeamento de uma reação GVHD aguda (CASTOR e cols., 2010, 2011, REZENDE e cols., 2013).

4.3) Tratamento utilizado

Para estudar o papel das espécies reativas de oxigênio na GVHD, a formação e ativação do complexo NADPH oxidase foi inibido pelo tratamento com apocinina. Os camundongos B6D2F1 que receberam células de C57BL/6J (C57BL/6J para B6D2F1), ou seja, nos quais foi induzida à GVHD, foram divididos e nomeados em dois grupos: grupo GVHD ou veículo (animais doentes e não tratados com apocinina), grupo APO ou GVHD + APO (animais doentes e tratados com apocinina na dose de 3 mg/kg). Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (100 µL/animal) 30 minutos antes do transplante e, após o transplante de 24 em 24 horas até o final do experimento. A apocinina foi dissolvida em PBS

estéril contendo 5% de etanol. Animais do grupo GVHD receberam injeção intraperitoneal de PBS contendo 5% de etanol. Animais B6D2F1 que receberam células B6D2F1, ou seja, resultantes do transplante singênico (que não desenvolvem a GVHD) não receberam nenhum tipo de tratamento.

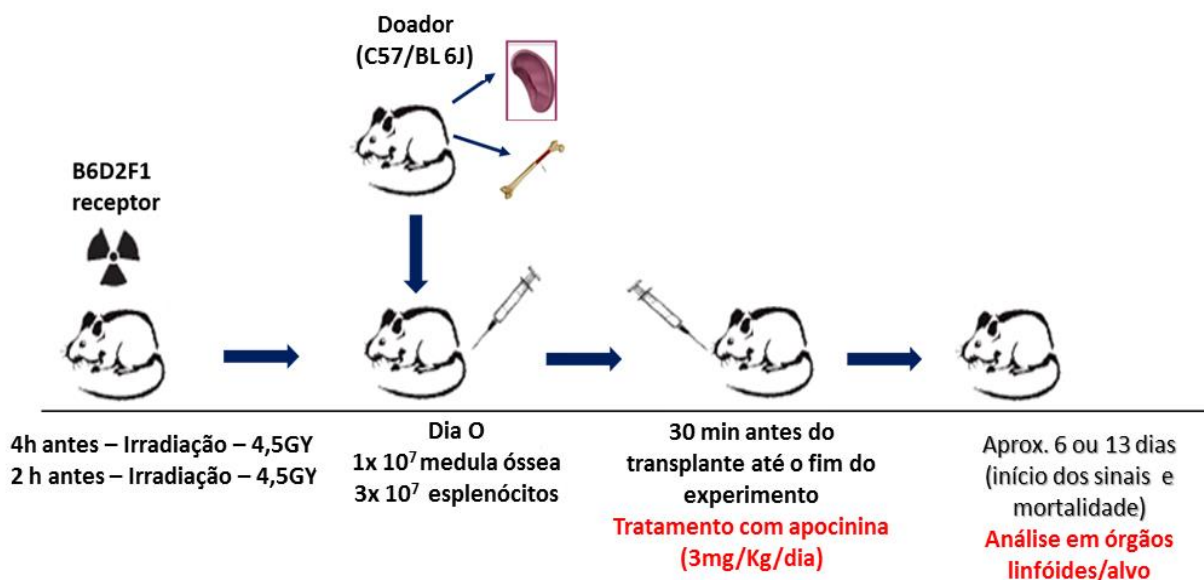


FIGURA 3 – INDUÇÃO DA GVHD: NO MESMO DIA DA IRRADIAÇÃO (MODELO DE IRRADIAÇÃO TOTAL: 9GY), OS CAMUNDONGOS B6D2F1 RECEBERAM TRANSPLANTE DE 3 x 10⁷ ESLENOCITOS E 1 x 10⁷ CÉLULAS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA FEMORAL ORIUNDAS DOS DOADORES PARENTAIS, C57BL/6J. O TRANSPLANTE ENTRE CAMUNDONGOS B6D2F1 PARA B6D2F1 NÃO RESULTA EM GVHD E FOI DEFINIDO COMO GRUPO CONTROLE.

4.4) Análise de estresse oxidativo:

O estresse oxidativo foi avaliado através da análise dos níveis de ROS, da peroxidação lipídica (formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico/TBARS) e da expressão da SOD (superóxido dismutase), conforme metodologia descrita abaixo:

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

A produção de ROS foi analisada por fluorescência, no início dos sinais (aproximadamente seis dias após o transplante) e da mortalidade (treze dias após o transplante), nos seguintes órgãos: medula óssea, baço, fígado e intestino de animais dos

grupos controle, veículo e tratados com apocinina. Esta produção foi mensurada 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). 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), por 30 minutos, em estufa a 30°C. Esta etapa do experimento foi realizada ao abrigo da luz, pois o marcador utilizado é fotossensível. 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.

- Análise da peroxidação lipídica:

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Tal método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malonaldeídos (MDA) e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada e por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano lida em espectrofotômetro (532nm e 600 nm); os resultados são expressos em nmol/mL de plasma. Desta maneira, órgãos alvo da GVHD (fígado e intestino) foram coletados no início dos sinais e da mortalidade para análise da peroxidação lipídica.

- Análise das enzimas antioxidante: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) por western blot

As amostras de intestino e fígado foram purificadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas com comassie blue. As amostras dos géis foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose e bloqueada por 30 minutos com leite em pó desnatado diluído (3%) em PBS. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpos

primários específicos diluídos em uma solução a 3% de Albumina Bovina (BSA) em PBS 0,03% Tween-20 e 0,05% de triton-100 por 1 hora ou overnight. Após este período, foram realizadas sucessivas lavagens em PBS 0,03% de Tween-20 e incubado com anticorpo secundário por mais uma hora. Lavagens em PBS 0,03% de Tween-20 foram realizadas e então a membrana foi revelada com quimioluminescente ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) e autor radiografada.

4.5) Análise histopatológica

- Confeção de lâminas histológicas

Porções do intestino delgado (jejuno e íleo) e fígado foram retiradas dos camundongos dos grupos estudados nos períodos correspondentes ao início do desenvolvimento dos sinais clínicos e da mortalidade. Os intestinos foram retirados inteiros, lavados com PBS1x. As porções do jejuno e íleo foram separadas e preparadas em forma de rocamboles utilizando palitos de madeira (Figura 4), conforme descrito em ARANTES; NOGUEIRA (1997). Os rocamboles foram armazenados em formol tamponado (10% em PBS) por 24 horas e, em seguida, em álcool (70%) até o seu processamento. Durante o seu processamento os tecidos sofreram desidratação, realizada através de passagens subseqüentes em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto I, II e III – 30 minutos cada); difanização 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, permanecendo ali por 24 horas. Os blocos foram levados ao micrótomo e cortes dos tecidos (espessura de 5µm) foram realizados. As lâminas contendo os cortes foram então desparafinizadas (xilol I e II – 20 minutos e álcool absoluto I, II e III, 90%,80%, 70% - 2 minutos em cada) e coradas com hematoxilina de Harris (20 segundos) e eosina (50 segundos), (H&E). Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá sintético. O fígado foi retirado armazenado em formol tamponado (10% em PBS) e lâminas histológicas foram confeccionadas, conforme acima descrito.

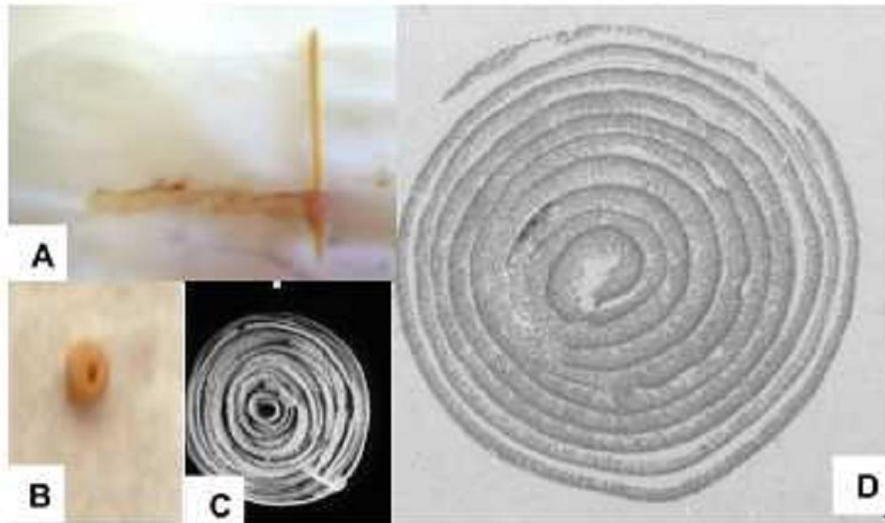


FIGURA 4. PREPARAÇÃO DOS INTESTINOS PARA CONFEÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS EM FORMA DE ROCAMBOLE. (A) OS INTESTINOS FORAM GENTILMENTE ENROLADOS COM A AJUDA DE UM PALITO DE MADEIRA COMEÇANDO O ROLO PELA SUA PORÇÃO INICIAL. (B) INTESTINO EM FORMA DE ROLO APÓS IMERSÃO EM FORMOL. (C) VISÃO SUPERIOR DO INTESTINO EM FORMA DE ROLO EM AUMENTO MAIOR. (D) CORTE EM MICRÓTOMO DO INTESTINO (FONTE: ARANTES; NOGUEIRA, 1997).

- Quantificação dos parâmetros histopatológicos ocasionada pela GVHD

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

Epitélio:

0 = sem alterações;

1 = alterações reacionais discretas;

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

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

Lâmina Própria:

- 0 = aspecto normal;
- 1 = discreto aumento de mononucleares na lâmina própria;
- 2 = discreto a moderado aumento de células inflamatórias, edema e congestão;
- 3 = celularidade aumentada com alargamento das vilosidades, edema e congestão.

Muscular e Serosa:

- 0 = sem alterações;
- 1 = discreto infiltrado e edema da serosa;
- 2 = moderado infiltrado inflamatório da muscular e serosa, em focos;
- 3 = sinais de necrose isquêmica e intensas alterações inflamatórias da muscular e da serosa.

Utilizando estes critérios somados, a porção do intestino que obteve pontuação de 0 a 3, apresentava-se normal, ou com alterações discretas, 4 a 6 alterações moderadas e 7 a 9 alterações acentuadas. Exemplo: epitélio (3) + lâmina própria (3) + muscular e serosa (3) = pontuação final: 9 – alterações acentuadas nas três estruturas (Figura 5). Foram examinados no mínimo três animais por grupo, trabalhando-se com a média obtida por grupo.

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

- 0 = normal;
- 1 = discreto vacuolização citoplasmática e eosinofilia focal;
- 2 = difusa vacuolização, alteração da forma do hepatócito, alterações nucleares acentuadas;
- 3 = necrose e vacuolização difusa, alteração da forma do hepatócito e alterações nucleares.

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 6).

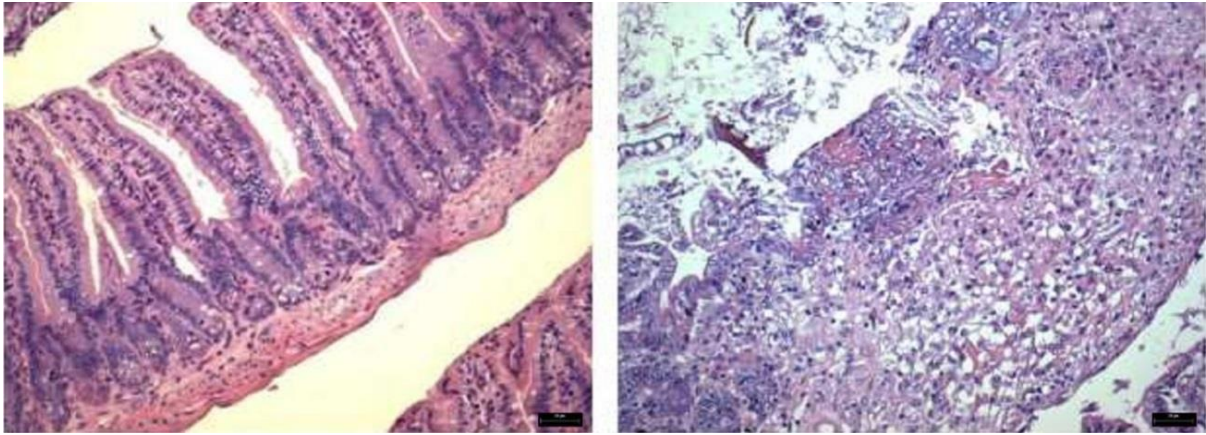


FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DOS CRITÉRIOS AVALIADOS PELA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO.

À ESQUERDA UMA FOTO DE UM INTESTINO AVALIADO COM GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA MÍNIMA. À DIREITA UM INTESTINO AVALIADO COM GRADUAÇÃO MÁXIMA APRESENTANDO HIPERPLASIA DO EPITÉLIO DAS CRIPTAS COM EROSÕES E ULCERAÇÕES DIFUSAS, CELULARIDADE AUMENTADA DA LÂMINA PRÓPRIA QUE SE CONFUNDE À CAMADA SUBMUCOSA DEVIDO À DESTRUIÇÃO DAS VILOSIDADES, EDEMA E CONGESTÃO. AS CAMADAS MUSCULAR E SEROSA APRESENTAM SINAIS DE NECROSE E INTENSAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS. BARRA DE ESCALA 50 UM.

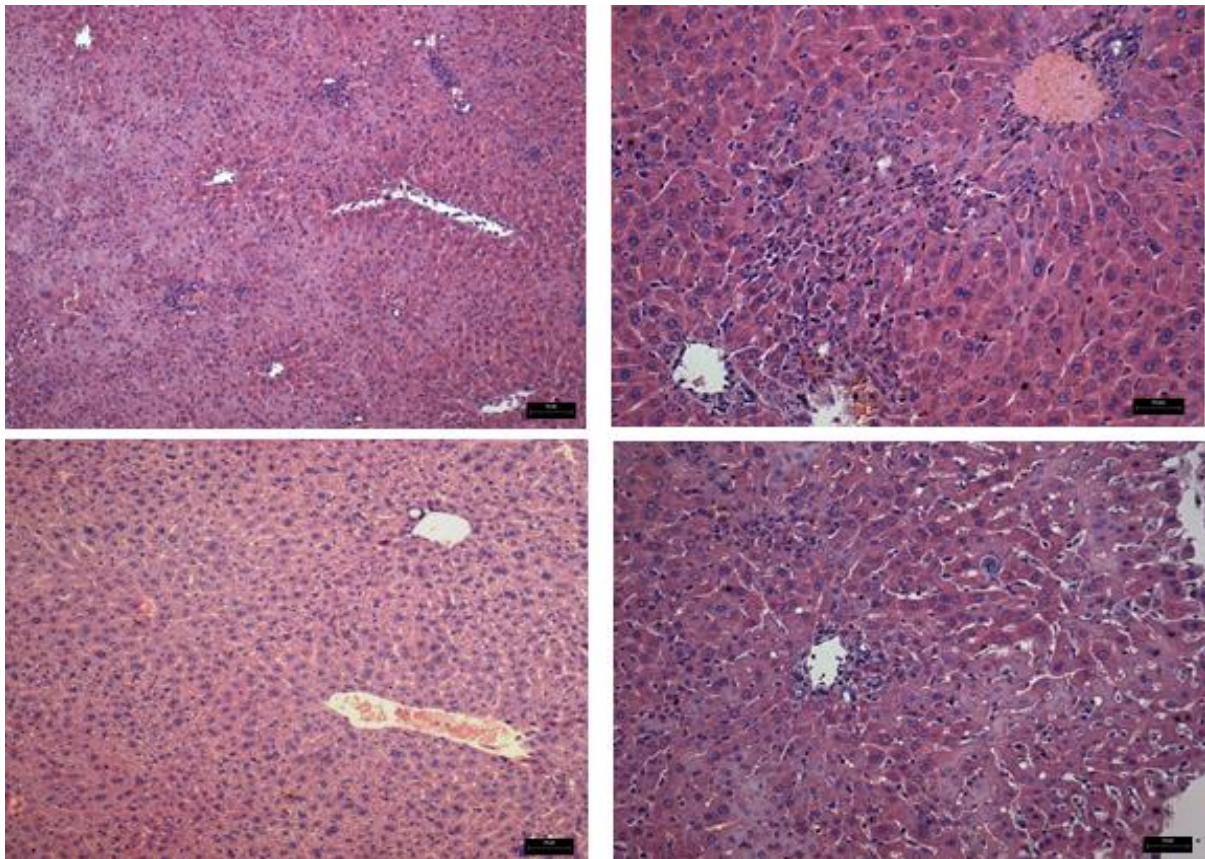


Figura 6 – Representação dos critérios avaliados pela análise histopatológica do fígado. À esquerda em cima uma foto de um fígado de um animal sem nenhuma alteração histopatológica. À direita, em cima, presença de congestão vascular com infiltrado acentuado nos vasos da área periportal e veia

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. Barra de escala = 50uM

4.6) Quantificação de citocinas e quimiocinas

O fígado e intestino foram retirados no período correspondente ao início da mortalidade dos camundongos com GVHD, aproximadamente 13 dias após o transplante. Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos deste órgão utilizando kit 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.

4.7) Análise do acúmulo de macrófagos no tecido hepático e intestinal

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 e de intestino foi ressuspendida 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.

4.8) *Análise do recrutamento celular através de microscopia intravital*

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

O número de leucócitos rolando e aderentes foi determinado após análise das imagens gravadas. O número de células rolando foi determinado pela contagem de células passando por um determinado ponto marcado no vaso por minuto. Um leucócito foi considerado aderente quando permanecia parado por pelo menos 30 segundos, e o número de leucócitos aderentes foi quantificado contando o número de células aderentes dentro de um comprimento de 100 µm de vaso.

4.9) *Análise do perfil celular por citometria de fluxo:*

Para caracterizar o perfil celular em órgãos linfóides (baço, medula óssea, fígado e intestino) de camundongos dos diferentes grupos experimentais, utilizamos a técnica de citometria de fluxo (aparelho Becton Dickenson FACScan). As células foram plaqueadas (em placa de fundo em “U”, 96 wells aproximadamente 1×10^6 células/well). Os anticorpos para marcação de superfície e os controles negativos (isotipos IgG1 e IgG2a), diluídos na

solução de diluição de anticorpos, foram adicionados nas concentrações previamente padronizadas, na quantidade de 20 µl/poço ou tubo tipo *eppendorf* e incubados por 30 minutos, 4°C sobre abrigo da luz. Em seguida adicionou-se 150 µl/poço de “tampão recomendado pelo fabricante do anticorpo”) gelado e as células foram centrifugadas e posteriormente fixadas em formaldeído 4% e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Para marcação intracelular adicionou-se 150 µl/poço de tampão de permeabilização (BD: Becton Dickinson and Company, EUA) por 30 minutos a 37°C (em estufa) ao abrigo de luz. Em seguida centrifugou-se e adicionou-se os anticorpos para marcação intracelular dissolvidos na solução de diluição de anticorpos em concentrações previamente padronizadas, na quantidade 20 µl/poço. Em seguida adicionou-se 150 µl/poço de tampão gelado e as células foram centrifugadas, fixadas em formaldeído 4% para posterior leitura no aparelho.

4.10) Avaliação dos parâmetros clínicos e da sobrevivência

Após o transplante de esplenócitos e células provenientes da medula óssea, houve acompanhamento da sobrevivência e 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; CASTOR e cols., 2010, 2011, 2012; REZENDE e cols., 2013) 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. Foi pontuado com zero o animal que não teve perda de peso corporal; 0,5 quando a perda foi de até 10% do peso corporal inicial; 1,0 quando a perda de peso foi entre 10 a 25%; 1,5 quando a perda de peso foi entre 25% a 50% em relação ao peso inicial e 2,0 quando a perda de peso corporal foi acima de 50%. A postura foi graduada de acordo com o grau de inclinação ou flexão do tronco. O animal ganhou zero quando não tinha nenhuma inclinação aparente; 0,5 para uma leve inclinação; 1,0 para uma inclinação moderada e 2,0 quando a inclinação se agravou, levando o camundongo a assumir uma flexão de tronco próxima do total com aproximação das patas dianteiras às traseiras. A

atividade foi pontuada com zero quando não tinha alterações, 0,5 quando foi observada uma apatia leve, 1,0 para apatia moderada e 2,0 quando a apatia ficou grave (letargia). As fezes dos animais também foram avaliadas e pontuadas, quanto à presença de diarreia em zero (fezes sem alterações), 1,0 (fezes pastosas) e 2,0 (fezes líquidas) e quanto à presença ou não de sangue: 0 (ausência), 1,0 (moderada quantidade de sangue) e 2,0 (grande quantidade de sangue). Os parâmetros clínicos foram analisados de 2 em 2 dias até o grupo GVHD atingir 100% de mortalidade.

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

TABELA 1 – ESCALA CLÍNICA. ADAPTADA A PARTIR DE DADOS FORNECIDOS PELA LITERATURA PARA A VERIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS DESENCADEADOS PELA REAÇÃO INFLAMATÓRIA GERADA PELA GVHD (COLSON E COLS., 2004; CASTOR E COLS., 2010, 2011, 2012; REZENDE E COLS., 2013, BERNARDES E COLS., 2015).

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

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

4.12) Análise estatística

Os resultados são mostrados como média e erro padrão da média (\pm SEM). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste estatístico ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5) RESULTADOS

5.1) Participação das espécies reativas de oxigênio na GVHD

Para compreender o papel das espécies reativas de oxigênio na GVHD mensuramos os níveis destas moléculas em órgãos alvo (fígado e intestino) e linfoides (baço e medula óssea) de camundongos submetidos à doença, em dois períodos distintos: início do desenvolvimento dos sinais clínicos e início da mortalidade, períodos que correspondem a aproximadamente 6 e 13 dias após o transplante, respectivamente. Observou-se que camundongos do grupo GVHD (veículo) apresentaram níveis significativamente aumentados de ROS na medula óssea e baço no início do desenvolvimento dos sinais clínicos (Figura 7A e 7B). No início da mortalidade, verificou-se um aumento de ROS no baço e fígado de camundongos submetidos à doença (Figura 7E e 7F) quando comparados ao grupo controle. O bloqueio farmacológico da atividade do complexo NADPH oxidase, através do tratamento com apocinina em camundongos com GVHD levou a uma diminuição de ROS na medula óssea (no início dos sinais), baço (nas duas fases da doença) e fígado (no início da mortalidade) (Figura 7A, B, E e F). Ressalta-se que quando mensurados os níveis de ROS no intestino destes camundongos nos períodos citados, não foram observadas diferenças entre os 3 grupos analisados (controle, veículo e APO) (dados não mostrados). Devido à importância deste órgão na GVHD e diante dos demais resultados obtidos repetiremos este experimento.

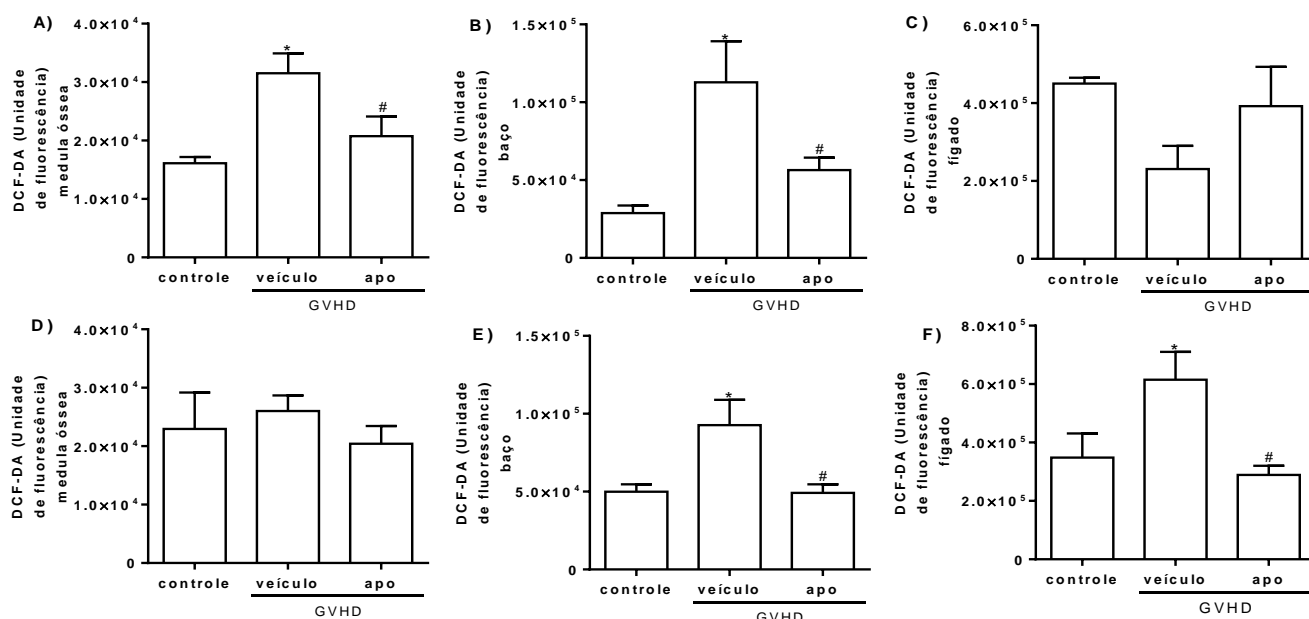


Figura 7 – Aumento de espécies reativas de oxigênio em órgãos alvo de camundongos submetidos à GVHD. A GVHD foi induzida pela transferência de 3×10^7 esplenócitos e de 1×10^7 células de células medula

óssea de camundongos doadores semialogênicos C57BL/6J-WT para camundongos B6D2F1 irradiados com dose de 9 Gy. Camundongos que receberam esplenócitos + células medulares de camundongos singênicos (B6D2F1 para B6D2F1) não desenvolveram a doença e constituíram o grupo controle. Os camundongos submetidos a GVHD foram divididos em 2 grupos: veiculo e APO (GVHD tratados com apocinina (3mg/Kg/dia), por via intraperitoneal (i.p), iniciado 30 minutos antes do trasplante e realizado até o final do experimento. Os camundongos dos três grupos foram sacrificados no início dos sinais clínicos (6 dias após o transplante) (A-C) e no início da mortalidade (13 dias após o transplante) (D-F) para mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em órgãos alvo e linfóides por fluorescência. Medula óssea (A e D), baço (B e E), fígado (C e F). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (n = 6). *p<0.05 comparado ao controle e #p<0.05 comparado ao GVHD.

Sabe-se que o aumento de ROS pode estar associado ao estresse oxidativo caracterizado por alteração na permeabilidade e destruição da membrana celular, processo denominado peroxidação lipídica (FREITAS e cols., 2010, ZHANG e cols., 2011; GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012; CAMPS; GARCIA-HEREDIA, 2014). Considerando que camundongos com GVHD apresentaram aumento de ROS (figura 7), o próximo objetivo deste estudo foi verificar se este aumento estaria associado à peroxidação lipídica. Para isto, realizamos um ensaio enzimático para substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e intestino (Jejuno-íleo) dos camundongos com GVHD, nos diferentes tempos após o transplante. Embora, no início dos sinais da GVHD não observou-se diferenças entre os grupos (figura 8 A-B), quando analisado o período da mortalidade verificou-se um aumento nos níveis de TBARS nos dois órgãos analisados em camundongos submetidos à GVHD quando comparado a camundongos submetidos ao transplante de células singênicas (grupo controle). O tratamento com apocinina inibiu a peroxidação lipídica observada nos animais que desenvolveram a doença (figura 8 C-D).

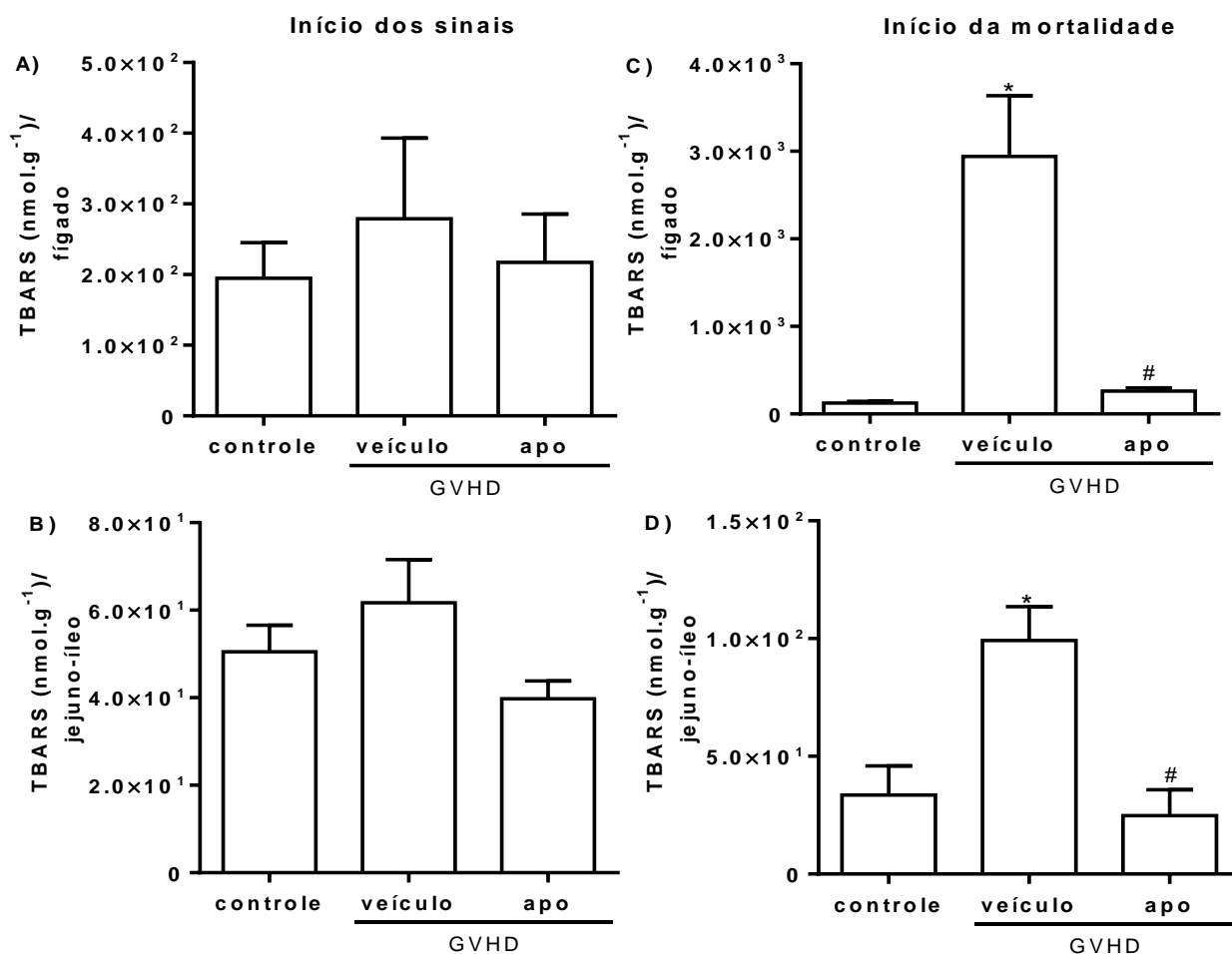


FIGURA 8 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO E NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3X10⁷ ESLENÓCITOS E DE 1X10⁷ CÉLULAS DE CÉLULAS MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1 IRRADIADOS COM DOSE DE 9 Gy. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO. OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DOS SINAIS CLÍNICOS (6 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) (A E B) E INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) (C E D) PARA ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) NO FÍGADO (A E C) E INTESTINO (B E D). OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± SEM (N = 6). *P<0.05 COMPARADO AO GRUPO CONTROLE E #P<0.05 COMPARADO AO GRUPO GVHD.

Diante da importância de enzimas antioxidantes na inibição do estresse oxidativo, analisamos por western blotting, a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD1 e SOD2) e catalase no fígado e intestino, no início da mortalidade da doença e não foi

observada alteração na expressão destas enzimas entre os 3 grupos analisados (dados não mostrados).

Uma vez que camundongos com GVHD apresentaram aumento de ROS (figura 7) e da peroxidação lipídica (figura 8) em órgãos alvo e sabendo que a preservação destes é essencial para o controle da doença, os próximos experimentos foram realizados no fígado e intestino de camundongos submetidos à GVHD. Para melhor elucidar os resultados dos nossos experimentos, iremos abordá-los separadamente.

5.2) Efeitos do aumento de ROS e da peroxidação lipídica na resposta inflamatória desencadeada no fígado de camundongos submetidos à GVHD

Para confirmar a hipótese de que as ROS poderiam contribuir para os mecanismos de desencadeamento e/ou manutenção da resposta inflamatória na GVHD, o fígado de camundongos submetidos à doença foram coletados para análises histopatológicas, acúmulo de células inflamatórias, fenotipagem celular e níveis de citocinas e quimiocinas.

Secções de fígado foram processadas para análise histopatológica após o transplante. Quando avaliado a sua histopatologia no início dos sinais (6 dias após o transplante) verificou-se que todos os grupos apresentaram alterações morfológicas, caracterizadas principalmente por moderado infiltrado inflamatório. O grupo tratado com apocinina não apresentou modificação nessas alterações (dados não mostrados). Em contrapartida, na fase de início da mortalidade (13 dias após o transplante), camundongos do grupo GVHD sem tratamento (veículo) apresentaram alterações histológicas no fígado, caracterizada por acentuada lesão hepática distribuída ao longo de todo o parênquima do órgão associada a um intenso infiltrado inflamatório e necrose de hepatócitos (figura 9 B e D). O tratamento com apocinina preservou a histologia do tecido hepático com diminuição significativa do acúmulo de células inflamatórias e de áreas edemaciadas e de necrose (figura 9 C e D). As setas da figura B representam áreas de necrose e infiltrado inflamatório no fígado de camundongos submetidos à GVHD que não foram tratados com apocinina.

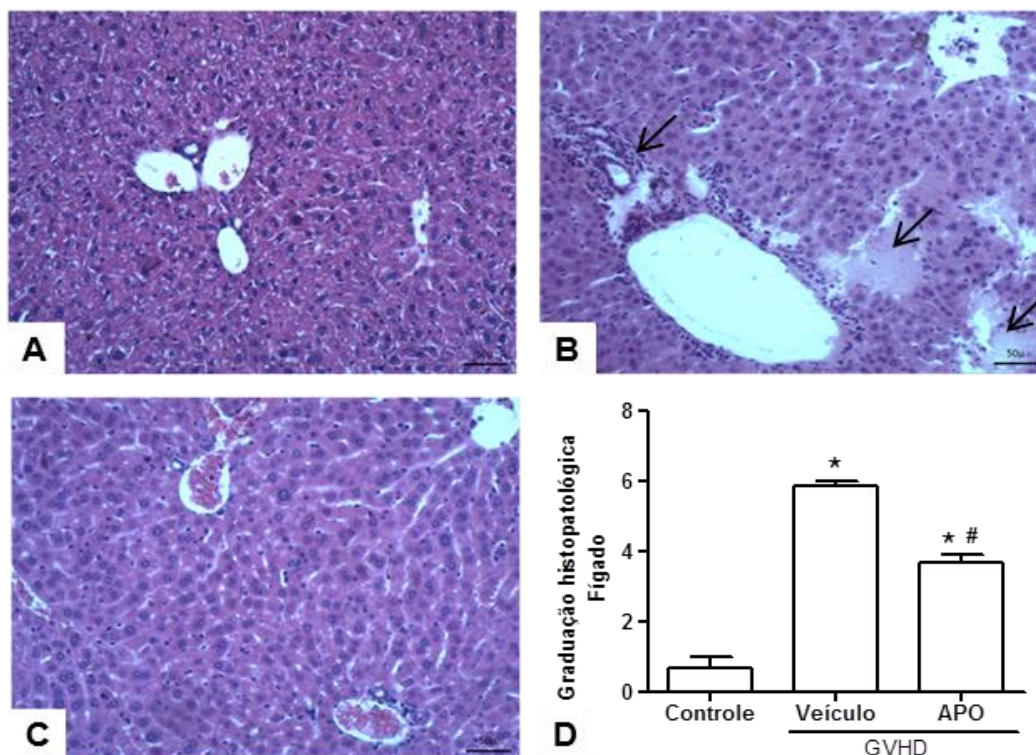


FIGURA 9 – TRATAMENTO COM APOCININA REDUZIU A GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS COM GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGÊNICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE (A). OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO (B) E APO (C) (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO FÍGADO FORAM COLETADAS E PROCESSADAS PARA ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS. AS SETAS DA FIGURA B REPRESENTAM ÁREAS DE NECROSE E INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS DO GRUPO VEÍCULO. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO (D). BARRA DE ESCALA 50 UM. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM (N = 4). *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD.

Uma vez que a menor lesão hepática observada em camundongos com GVHD tratados com apocinina esteve associada a um menor infiltrado inflamatório, nosso próximo passo foi avaliar o perfil celular no fígado destes camundongos. Para isto, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo para avaliar a proporção de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, 13 dias após o transplante (início da mortalidade dos camundongos com GVHD). Nossos resultados mostraram que a inibição do complexo NADPH-oxidase através da apocinina reduziu o infiltrado de células TCD4⁺ quando comparados ao grupo não tratado (figura 10 A e C). A porcentagem de TCD8⁺ analisada no fígado de camundongos com GVHD não mostrou

diferença mesmo com o tratamento (Figura 10 B-C). Devido à grande variação entre os resultados verificados dentro do grupo veículo, iremos repetir este experimento. Além disto, avaliamos a proporção de linfócitos B e células T NK+ e não houve diferença entre os grupos (dados não mostrados).

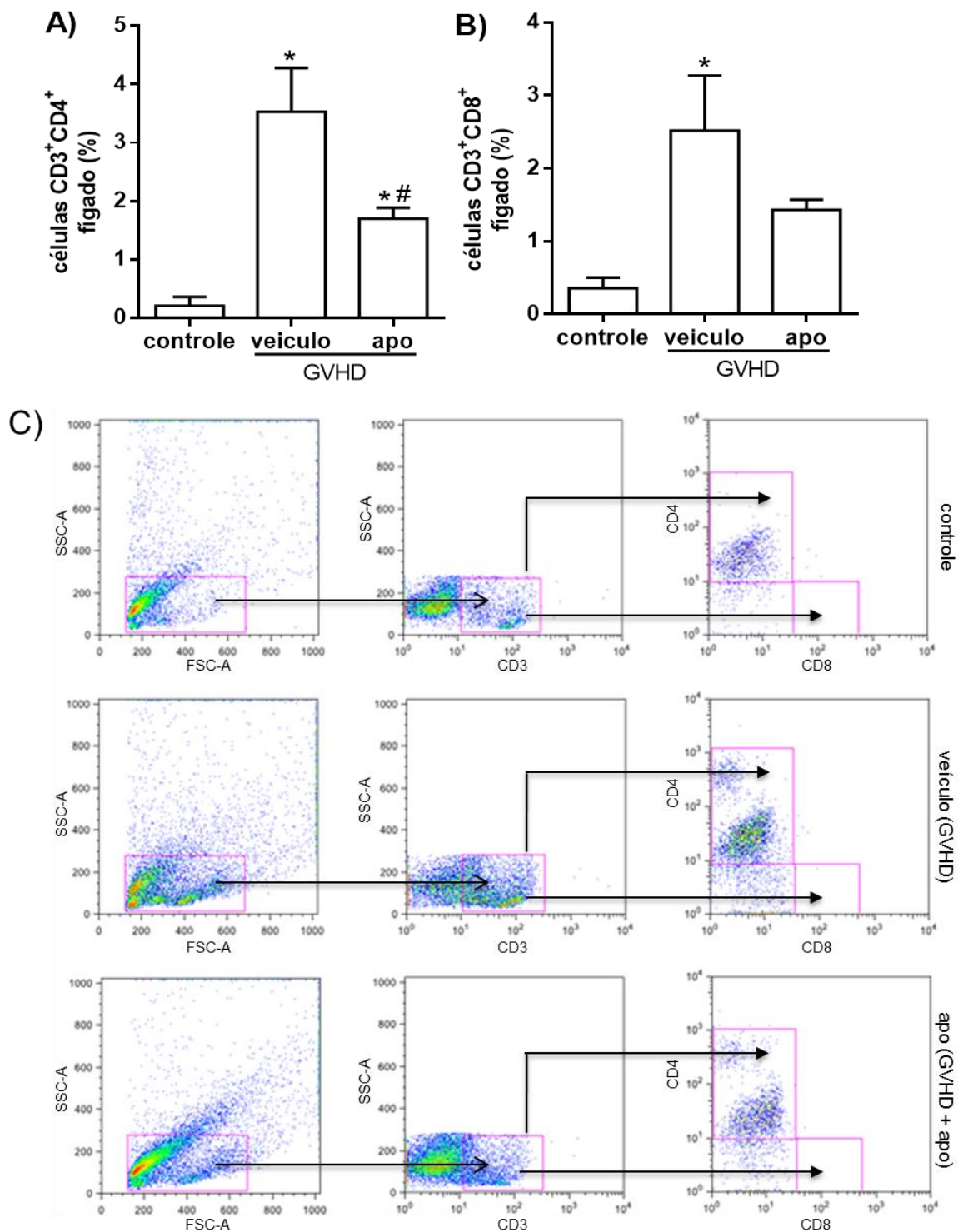


FIGURA 10. ACÚMULO DE CÉLULAS TCD4⁺ E TCD8⁺ NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3x10⁷ ESLENÓCITOS E DE 1x10⁷ CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

DOADORES SEMIALOGÊNICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO FÍGADO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS CD4+ (A) E CD8+ (B). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

Sabendo que os macrófagos participam na patogênese da GVHD através de sua função fagocitária, da apresentação de antígenos para linfócitos T e da expressão de receptores para citocinas pró-inflamatórias (FIEREN, 2012), o presente estudo avaliou por citometria de fluxo e ensaio enzimático pela análise da atividade da n-acetil- β -D-glicosaminidase -NAG o acúmulo destas células no fígado, 13 dias após o transplante. Foi verificado pelos dois métodos, um maior acúmulo de macrófagos no fígado de camundongos com GVHD (figura 11) quando comparado ao grupo controle. O tratamento com apocinina foi eficaz em diminuir este acúmulo quando comparado ao grupo veículo (figura 11). Ressalta-se que a quantificação indireta de macrófagos (NAG) também foi analisada na fase de início dos sinais clínicos e não houve diferenças significativas entre os grupos GVHD sem ou com tratamento (dados não mostrados).

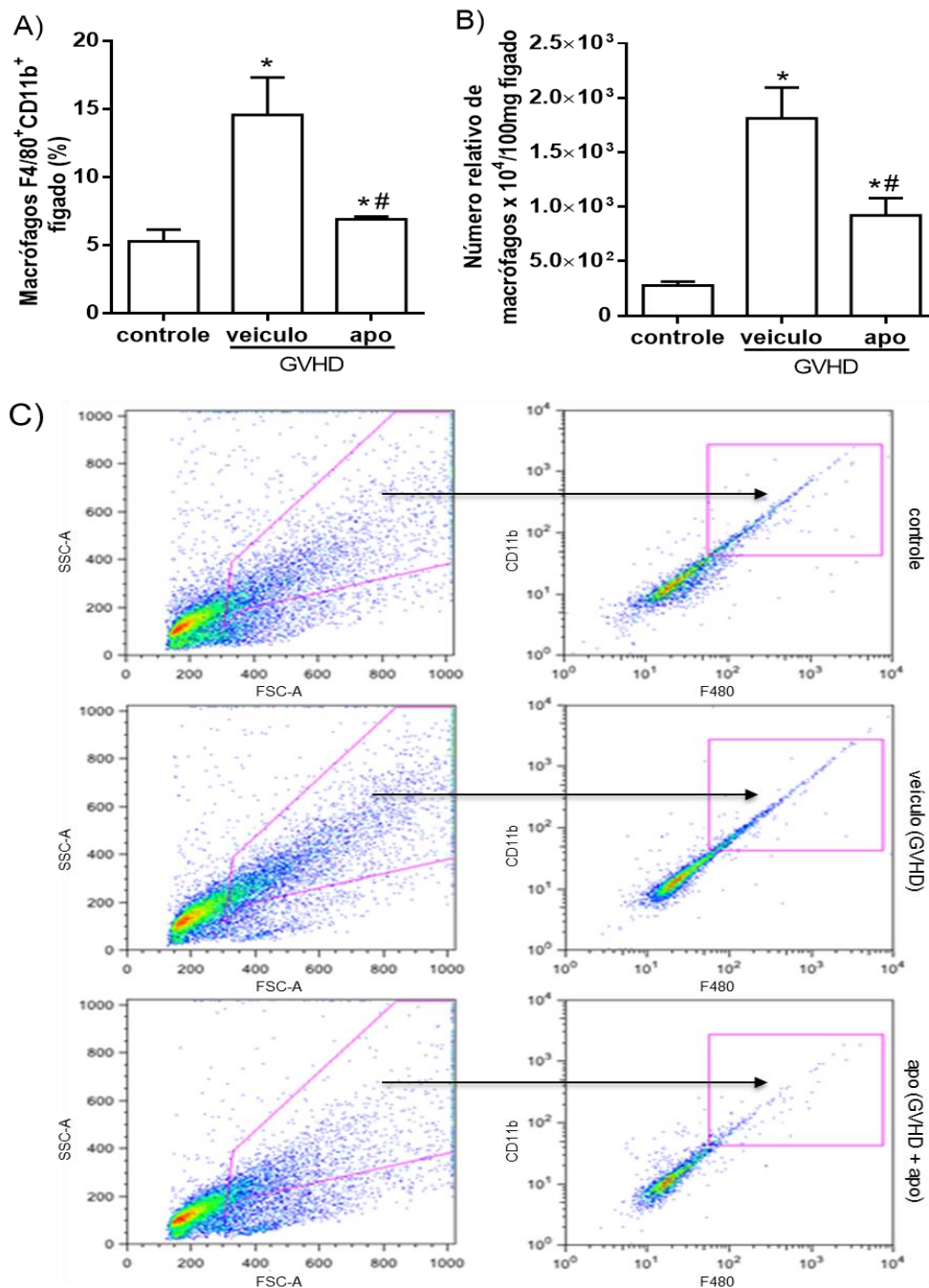


FIGURA 11. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNÓCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO FÍGADO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO ACÚMULO DE MACRÓFAGOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (A) E DA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS PELA ATIVIDADE DA N-ACETIL-B-D-GLICOSAMINIDASE (NAG) (B). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO

EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

O acúmulo de neutrófilos no fígado de camundongos com GVHD também foi analisado por citometria de fluxo e pela quantificação indireta através da análise da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), no início da mortalidade. Embora exista um aumento no acúmulo de neutrófilos nos animais submetidos à GVHD, não houve diferença entre os animais dos grupos com GVHD tratados e não tratados com apocinina (figura 12 A-C). A análise de MPO também foi realizada no início dos sinais em camundongos com GVHD e não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados com apocinina (dados não mostrados).

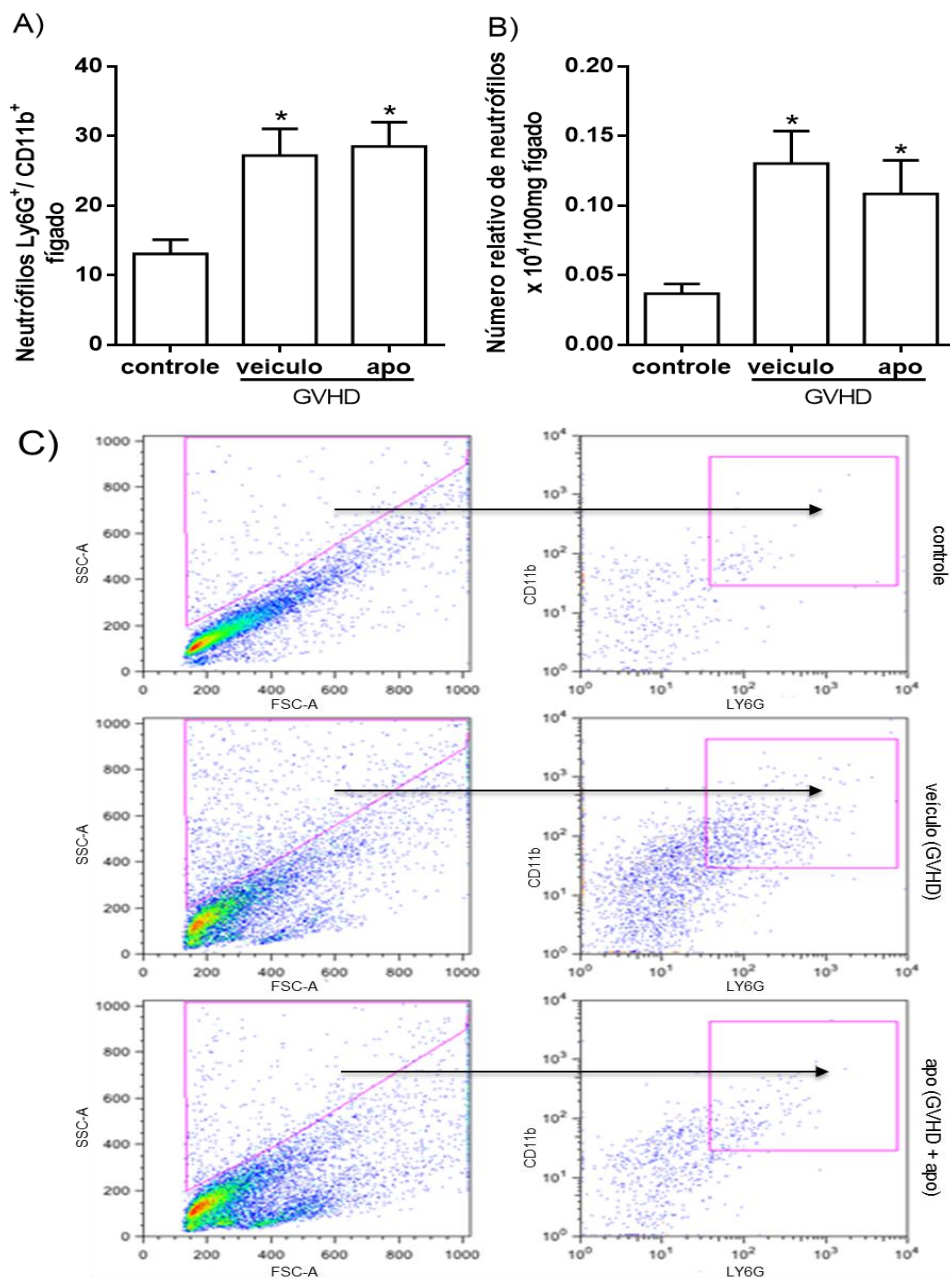


FIGURA 12. TRATAMENTO COM APOCININA NÃO INFLUENCIOU O ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO FÍGADO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (A) E DA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS PELA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E # $P < 0.05$ COMPARADO AO GVHD (N=5).

Sabendo que o aumento de ROS e do estresse oxidativo na GVHD está associado a maior infiltrado celular no fígado de camundongos submetidos à doença, o próximo experimento foi analisar se existe alguma relação entre a produção de ROS com a produção de quimiocinas e citocinas importantes na patogênese da GVHD. Para isto, foram analisados os níveis de IFN γ , TNF α , IL-17, IL-10, CCL2, CCL3 e CCL5 no fígado dos animais transplantados. Camundongos submetidos à GVHD apresentaram níveis elevados destes mediadores pró-inflamatórios quando comparados aos camundongos que receberam células singênicas (sem GVHD) na fase de início da mortalidade. Contudo, os camundongos submetidos à doença que foram tratados com apocinina apresentaram níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias menores que os dos animais com GVHD e similares aos dos animais do grupo controle (figura 13). Os níveis de IL-10 não foram diferentes entre os 3 grupos analisados (dados não mostrados).

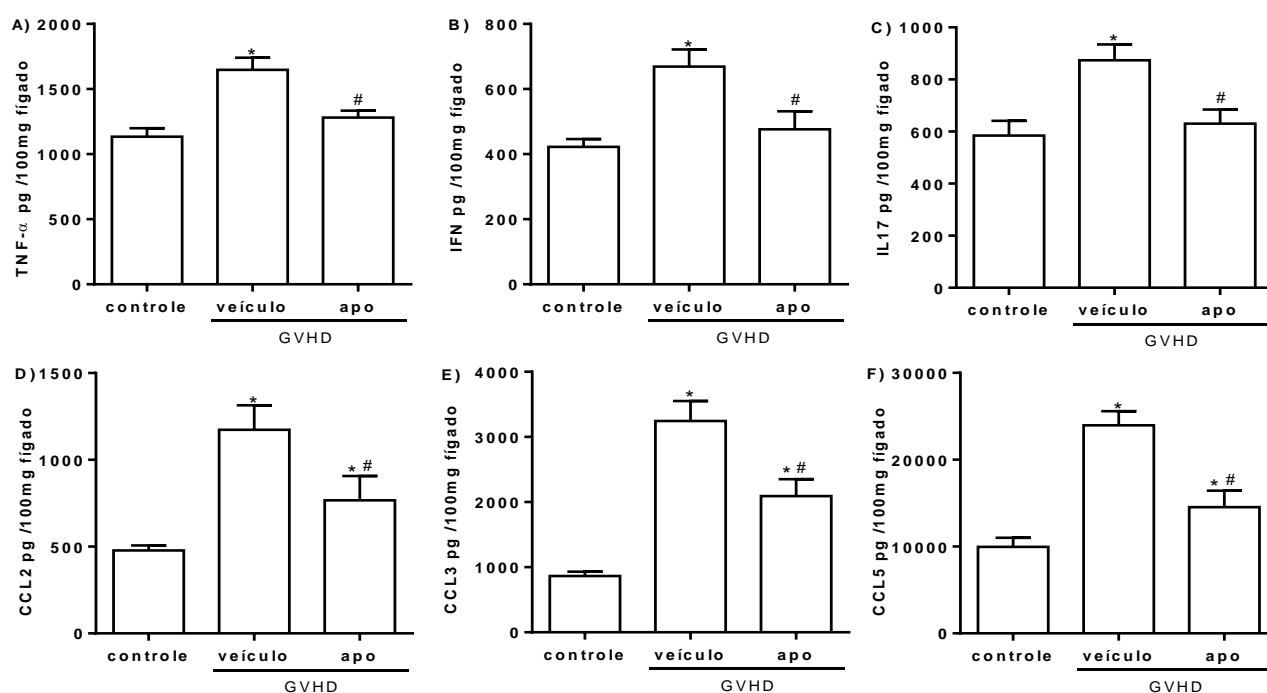


FIGURA 13. TRATAMENTO COM A APOCININA REDUZIU OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESLENÓCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS. OS CAMUNDONGOS

DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO FÍGADO FORAM COLETADAS PARA AVALIAÇÃO POR ELISA DOS NÍVEIS DE TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C), CCL2 (D), CCL3 (E) E CCL5 (F). RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO GRUPO CONTROLE (N=5) E # $P < 0.05$ COMPARADO AO GRUPO GVHD (N=6).

5.3) Efeitos do aumento de ROS e da peroxidação lipídica na resposta inflamatória desencadeada no intestino de camundongos submetidos à GVHD

Assim como o fígado, o intestino é um órgão alvo da GVHD, portanto, os próximos experimentos tiveram como objetivo compreender a função das ROS e da peroxidação lipídica na patogenia e resposta inflamatória induzida neste órgão após a indução da GVHD.

Secções de intestino foram processadas para análise histopatológica no início dos sinais clínicos e da mortalidade. Embora, não houvesse diferenças significativas entre os grupos analisados no início dos sinais, observou-se no intestino de camundongos com GVHD uma celularidade aumentada com alargamento das vilosidades e edema na lâmina própria, maior acúmulo de células inflamatórias nas camadas epiteliais, muscular e serosa, com áreas de necrose associada à hiperplasia das criptas e alargamento das vilosidades intestinais, no início da mortalidade. Neste mesmo período, o grupo tratado com apocinina mostrou uma menor graduação histopatológica da doença, com menor infiltrado inflamatório e diminuição significativa do processo degenerativo no intestino, quando comparado ao grupo não tratado (figura 14).

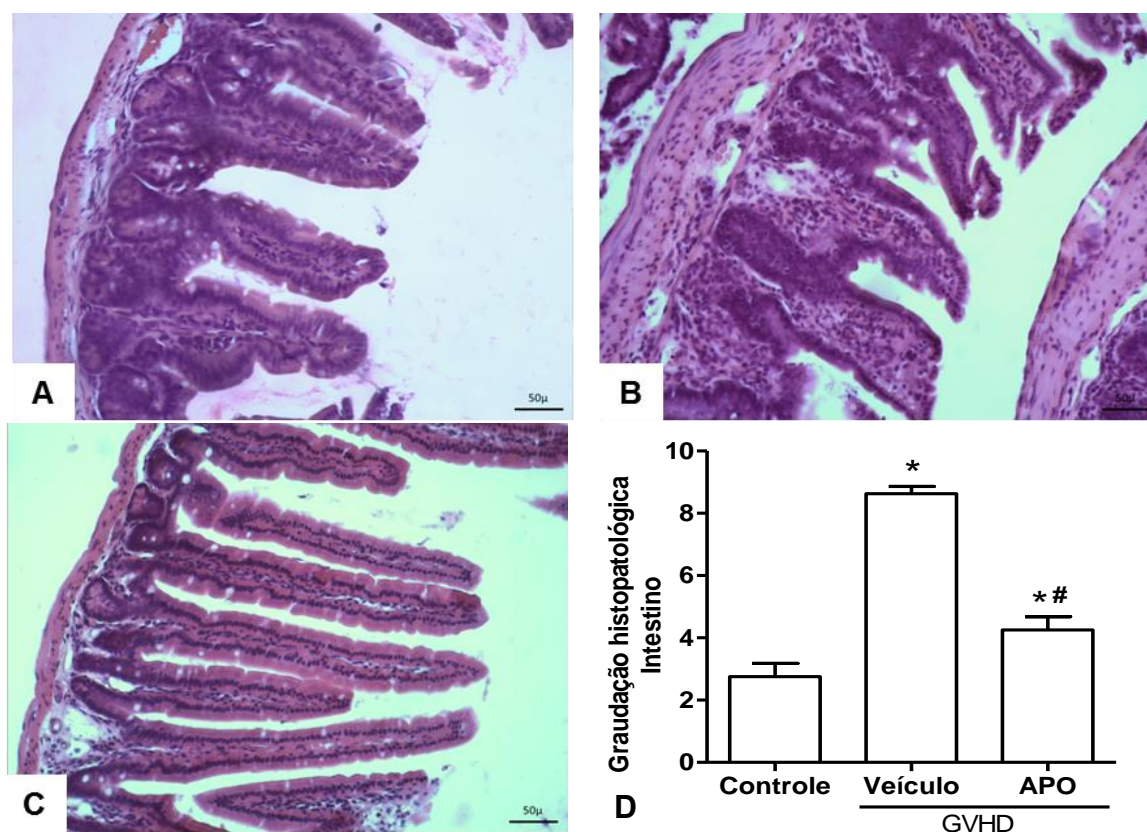


FIGURA 14 – TRATAMENTO COM APOCININA REDUZIU GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS COM GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESLENÓCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE (A). OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO (B) E APO (C) (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO INTESTINO FORAM COLETADAS E PROCESSADAS PARA ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO (D). BARRA DE ESCALA 50 μ m. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM (N = 4). *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD.

Como foi observado um maior acúmulo de células inflamatórias no intestino de camundongos com GVHD o próximo passo foi avaliar se existe alguma alteração da interação leucócito-endotélio através da avaliação do rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares intestinais por microscopia intravital. Os animais submetidos à GVHD apresentaram um maior número de células rolando e aderidas nas vênulas pós-capilares intestinais. Entretanto, o tratamento com apocinina diminuiu a interação do leucócito com endotélio justificando um menor acúmulo de células inflamatórias observadas nesse órgão (figura 15).

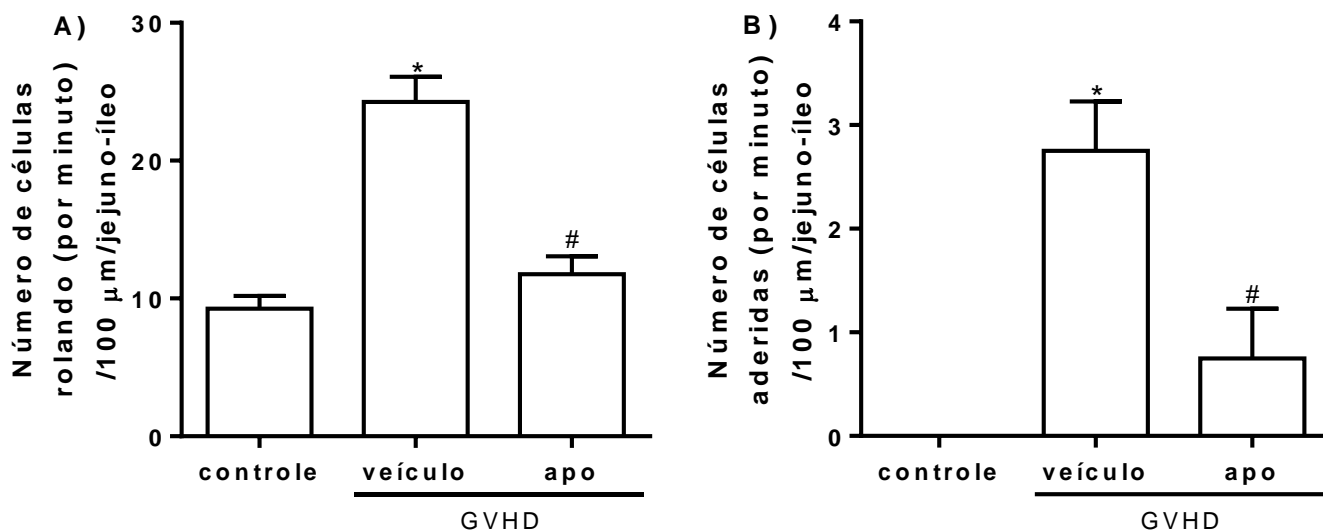


FIGURA 15. TRATAMENTO COM APOCININA RESULTOU EM MENOR ROLAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS NAS VÊNULAS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DE CÉLULAS MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGÊNICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1 IRRADIADOS COM DOSE DE 9 GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO. CAMUNDONGOS FORAM ANESTESIADOS E VÊNULAS INTESTINAIS ($\pm 40 \mu\text{m}$) SELECIONADAS PARA A CONTAGEM DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS ROLANDO E ADERENTES VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA INTRAVITAL NO INÍCIO DA MORTALIDADE DA GVHD (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE). (A) NÚMERO DE CÉLULAS ROLANDO/MINUTO; (B) NÚMERO DE CÉLULAS ADERENTES / 100 μm DE INTESTINO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E # $P < 0.05$ COMPARADO AO GVHD (N=5).

Uma vez que a menor lesão intestinal observada em camundongos com GVHD tratados com apocinina esteve associada a um menor infiltrado inflamatório, nosso próximo passo foi avaliar se o perfil celular deste infiltrado também estava alterado. Para isto analisamos, primeiramente, a proporção de células TCD4⁺ e TCD8⁺ no intestino dos animais dos diferentes grupos. Não houve diferença estatística na proporção de células TCD4⁺ infiltradas no intestino (jejuno-íleo) dos diferentes grupos (figura 16 A). Entretanto, os animais submetidos à GVHD apresentaram uma maior proporção de células TCD8⁺ no intestino e o tratamento com apocinina diminuiu o acúmulo dessas células (figura 16 B).

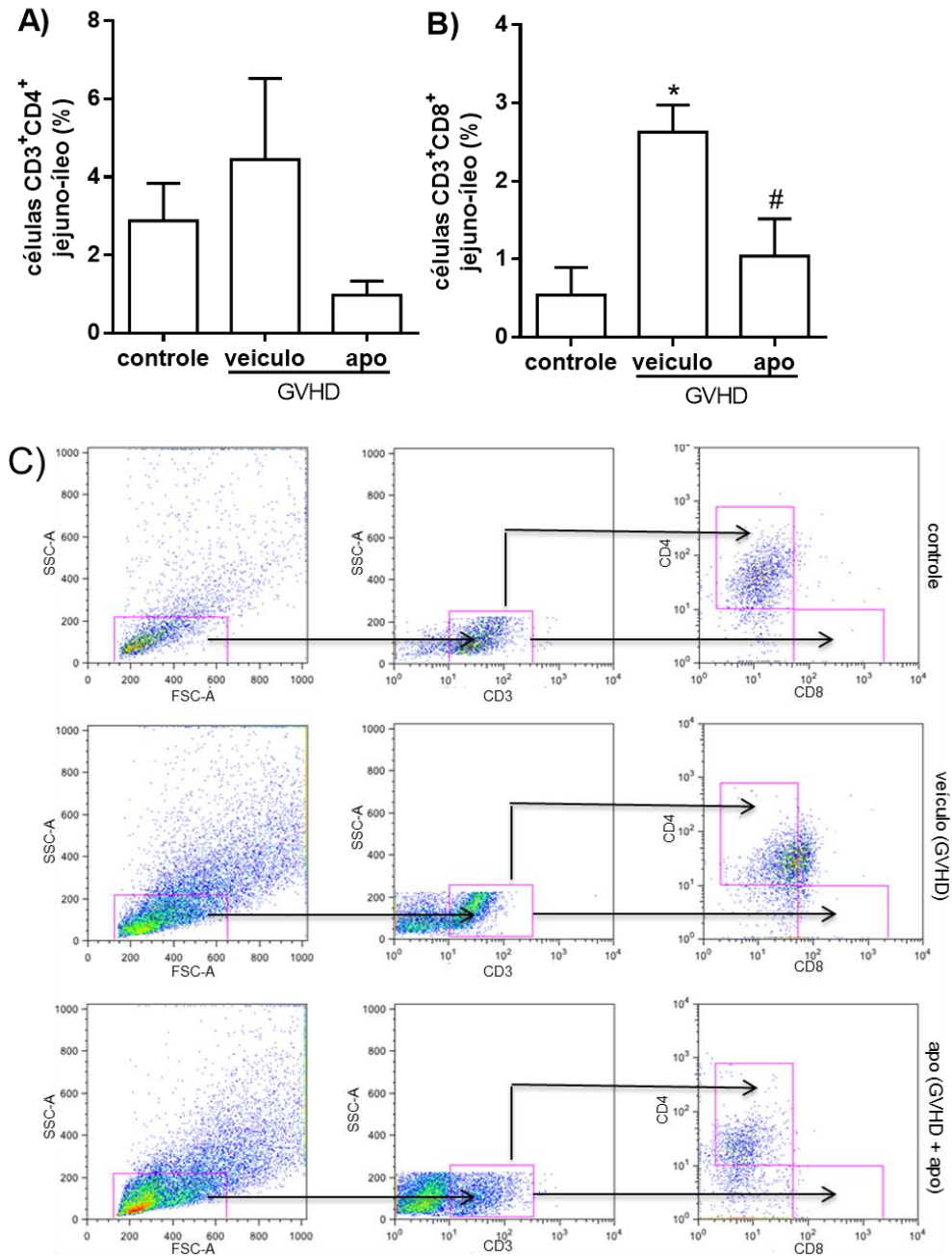


FIGURA 16. ACÚMULO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺ NO INTESTINO (JEJUNO ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3X10⁷ ESPLENÓCITOS E DE 1X10⁷ CÉLULAS DE CÉLULAS MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1 IRRADIADOS COM DOSE DE 9 Gy. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO. OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO INTESTINO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS CD4⁺ (A) E CD8⁺ (B). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

Avaliamos também a proporção de linfócitos B, Linfócitos T regulatórios e células NK, a qual não apresentou diferença entre o grupo com GVHD tratado e não tratado com apocinina (dados não mostrados).

O próximo passo foi analisar o acúmulo de macrófagos. Não verificamos diferenças no acúmulo destas células entre os grupos veículo e controle (figura 17A e C), por citometria, no início da mortalidade. Ressalta-se que pela mesma técnica realizada, foi possível verificar que o tratamento com apocinina diminuiu significativamente o acúmulo de macrófago no intestino. Baseado na importância destas células na patogenia da GVHD e diante de dados da literatura este experimento será realizado novamente. Entretanto, observou-se um aumento de macrófagos no intestino de camundongos com GVHD em relação ao grupo sem a doença (controle), quando realizado a técnica de quantificação indireta de macrófagos (NAG), no início da mortalidade (figura 16B). O tratamento com apocinina foi eficaz em diminuir o acúmulo destas células em camundongos submetidos ao GVHD (figura 17 B). É importante salientar que na fase de início dos sinais clínicos não houve diferença com relação ao acúmulo de macrófagos entre os 3 grupos analisados.

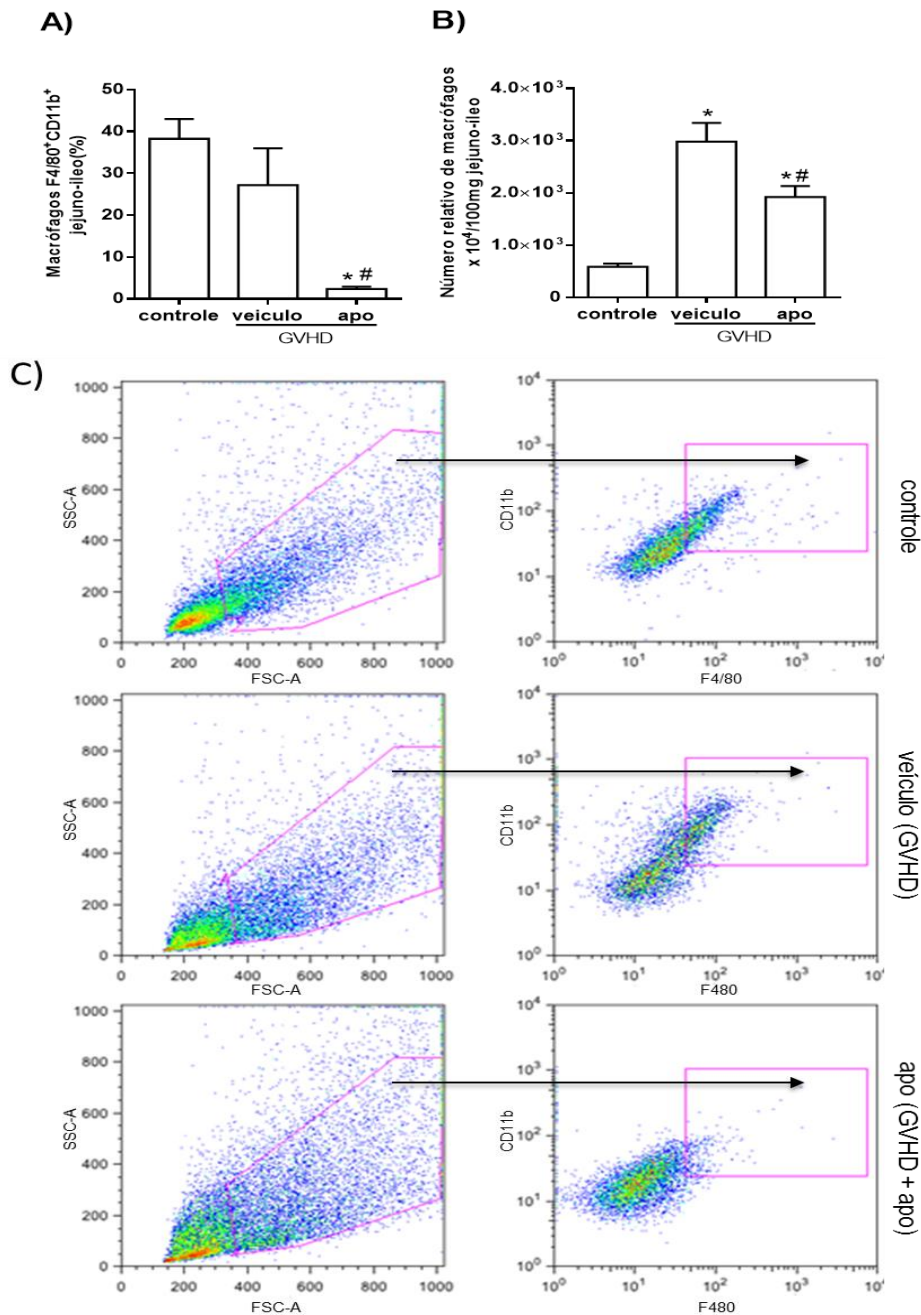


FIGURA 17. ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO INTESTINO (JEJUNO-ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9Gy. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO INTESTINO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO ACÚMULO DE MACRÓFAGOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (A) E DA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS PELA ATIVIDADE DA N-ACETIL-B-D-GLICOSAMINIDASE (NAG) (B). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE

FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

Recentemente um estudo realizado no intestino de camundongos com GVHD demonstrou a participação de neutrófilos na patogênese da doença. Para verificar se no nosso modelo experimental estas células teriam algum envolvimento no desenvolvimento da GVHD, e se a inibição na produção de ROS, através do tratamento com apocinina, influenciaria no acúmulo destas células no intestino de camundongos submetidos à doença, analisamos o acúmulo de neutrófilos, através de citometria de fluxo e da quantificação indireta de neutrófilos pela análise da atividade da mieloperoxidase (MPO). Quando analisamos o acúmulo de neutrófilos no intestino de camundongos com GVHD no nosso modelo experimental, não foram encontradas diferenças entre os animais tratados com ou não com apocinina (figura 18 A-C).

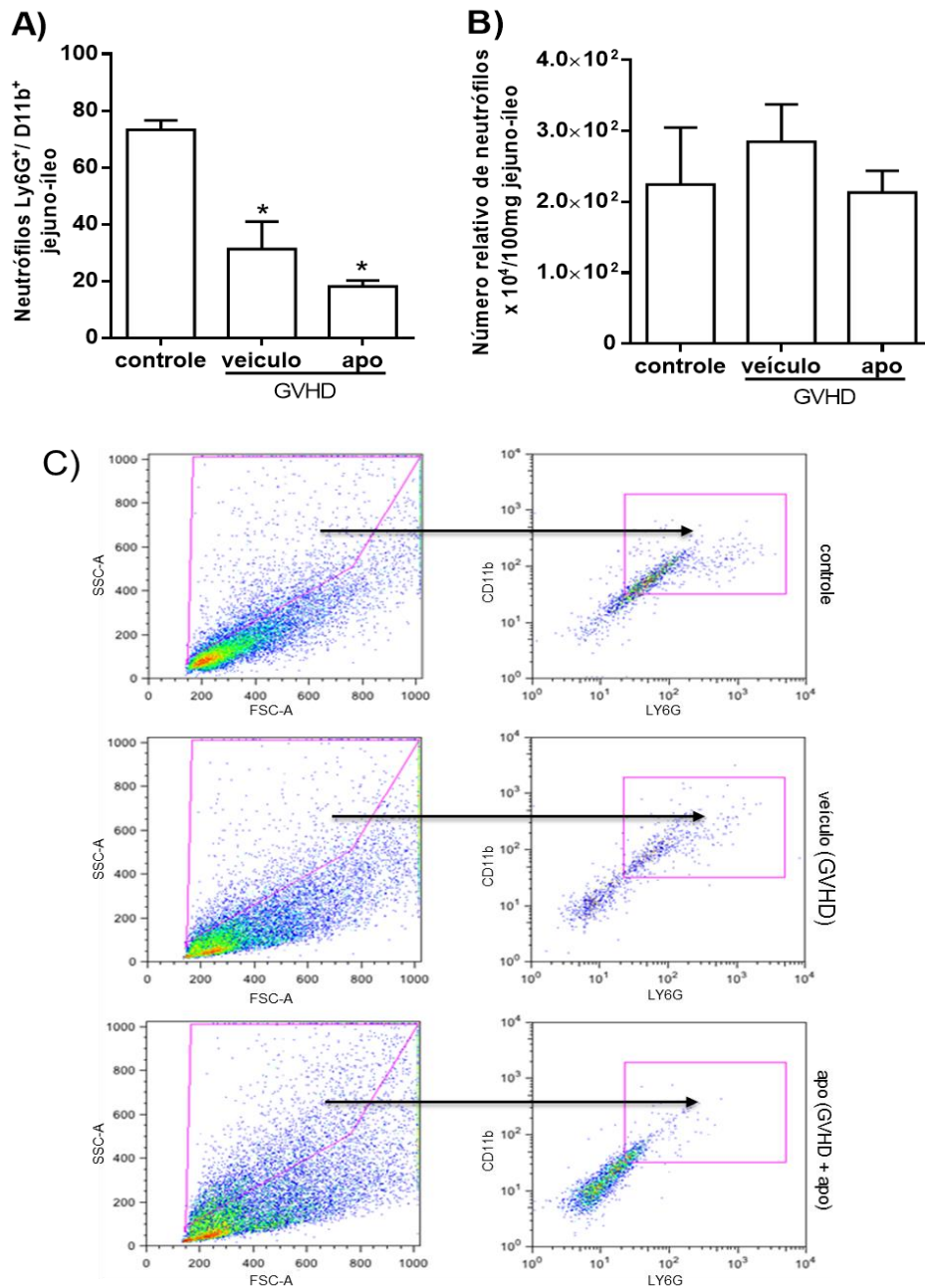


FIGURA 18. ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO INTESTINO (JEJUNO-ILEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P.), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO INTESTINO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (A) E DA QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS PELA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E # $P < 0.05$ COMPARADO AO GVHD (N=5).

O próximo passo foi investigar os níveis de quimiocinas e citocinas importantes (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-10, CCL2, CCL3 e CCL5) na patogênese da GVHD no intestino. Camundongos submetidos à GVHD apresentaram níveis elevados dos mediadores pró-inflamatórios quando comparados aos camundongos que receberam células singênicas (sem GVHD) na fase de início da mortalidade (figura 19A-F). Todavia, quando camundongos submetidos à doença foram tratados com apocinina verificou-se menores níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (figura 19 A-F). Os níveis de IL-10 não apresentaram diferença nos 3 grupos analisados (dados não mostrados).

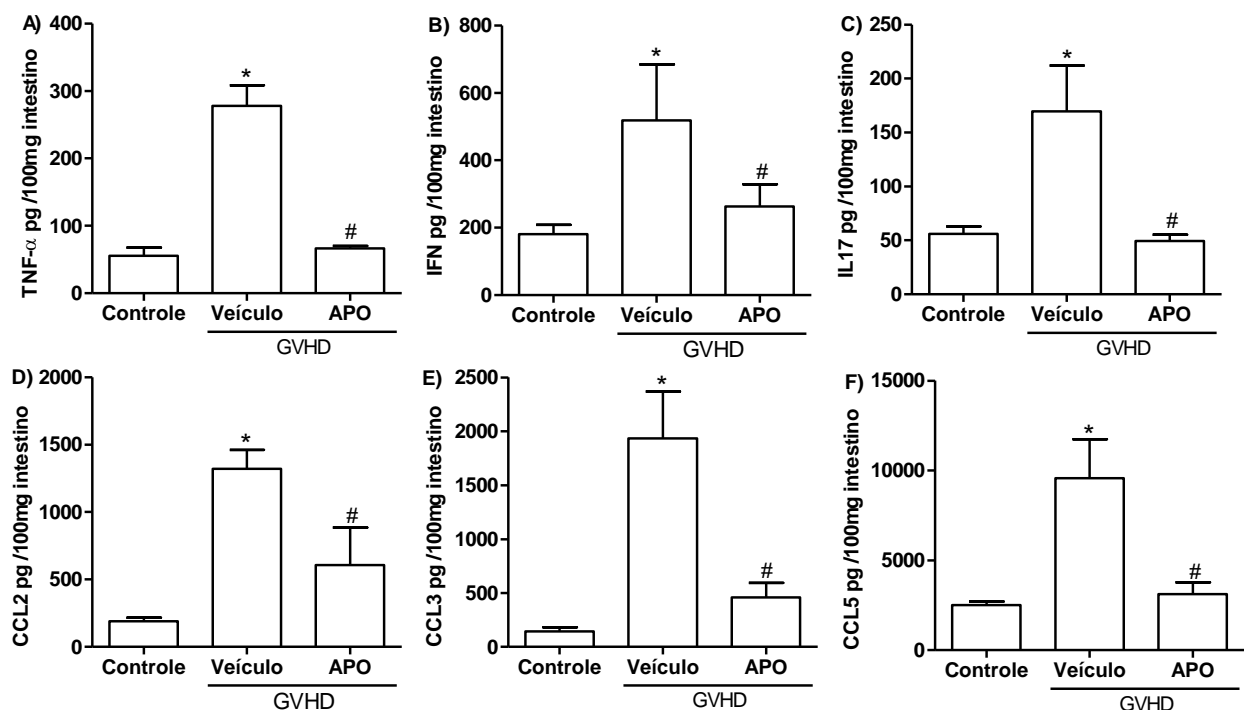


FIGURA 19. TRATAMENTO COM A APOCININA REDUZIU OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO INTESTINO (JEJUNO-ÍLEO) DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO INTESTINO FORAM COLETADAS PARA AVALIAÇÃO POR ELISA DOS NÍVEIS DE TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C), CCL2 (D), CCL3 (E) E CCL5 (F). RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. *P<0.05 COMPARADO AO GRUPO CONTROLE (N=5) E # P<0.05 COMPARADO AO GRUPO GVHD (N=6).

5.4) Efeitos do aumento de ROS na resposta inflamatória em órgãos linfóides de camundongos submetidos à GVHD

Uma vez que baço e medula óssea de camundongos transplantados apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio, analisamos o perfil celular destes órgãos. Através de citometria de fluxo foi analisada a proporção das seguintes células: células TCD4⁺, TCD8⁺, linfócitos Treg (FoxP3⁺), linfócitos B, células NK⁺, macrófagos e neutrófilos, no início da mortalidade dos camundongos com GVHD.

Embora os animais com GVHD apresentassem maior porcentagem de TCD4⁺, TCD8⁺ e de macrófagos na medula óssea quando comparada ao grupo controle, não verificamos nenhuma alteração com o tratamento da apocinina (dados não mostrados). As análises das demais células neste órgão também não apontaram diferenças entre os grupos controle, GVHD e APO (dados não mostrados).

No baço, a análise de células TCD4⁺ no baço não apontou diferenças significativas entre os camundongos com GVHD sem e com tratamento (figura 20 A). Entretanto, verificamos uma redução no acúmulo de células TCD8⁺ em camundongos com GVHD tratados com apocinina (figura 20B). Além disso, observou-se também um menor acúmulo de macrófagos no baço destes animais (figura 21).

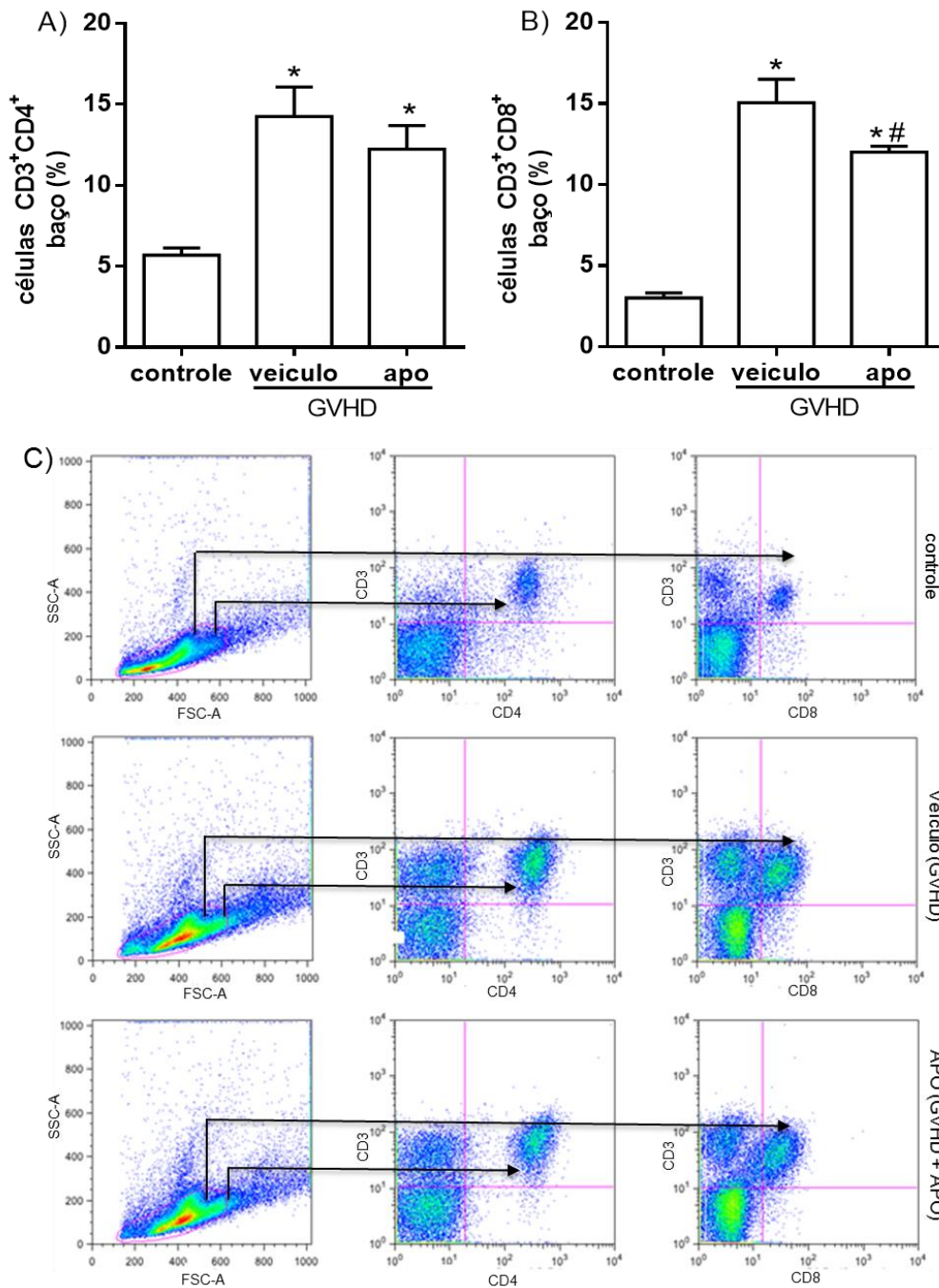


FIGURA 20. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE LINFÓCITOS CD8⁺ NO BAÇO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3x10⁷ ESLENÓCITOS E DE 1x10⁷ CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9Gy. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO BAÇO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS CD4⁺ (A) E CD8⁺ (B). EM C GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

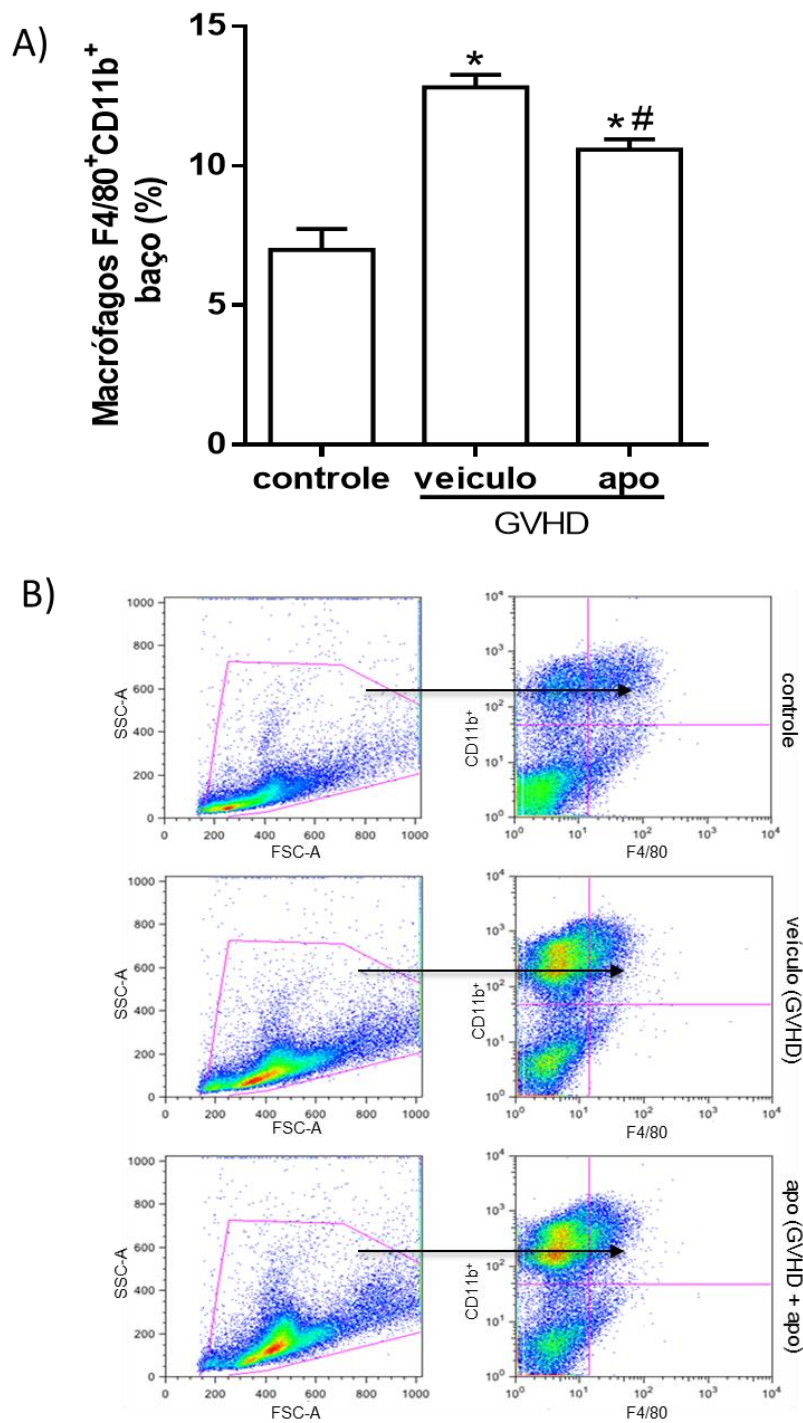


FIGURA 21. TRATAMENTO COM APOCININA LEVOU A MENOR ACÚMULO DE MACRÓFAGOS NO BAÇO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS E DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE LETAL DE 9GY. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 2 GRUPOS: VEICULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE E REALIZADO ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO). OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS NO INÍCIO DA MORTALIDADE (13 DIAS APÓS O TRANSPLANTE) E AMOSTRAS DO BAÇO FORAM COLETADAS PARA ANÁLISE DO ACÚMULO DE

MACRÓFAGOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (A). EM B GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E # $P < 0.05$ COMPARADO AO GVHD (N=5).

As análises de linfócitos Treg (FoxP3⁺), células NK⁺ e neutrófilos no baço não apresentaram diferenças significativas entre os 3 grupos (dados não mostrados).

5.5) Efeitos do bloqueio farmacológico da atividade do complexo NADPH oxidase sobre o desenvolvimento dos sinais clínicos e sobrevivência de camundongos com GVHD

Como observado nos dados acima, o aumento de ROS na GVHD esteve associado à peroxidação lipídica, aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas e maior acúmulo de células inflamatórias em órgãos alvo, resultando em lesões no parênquima dos órgãos. Em contrapartida, o bloqueio da atividade do complexo da NADPH-oxidase resultou em menores níveis de ROS, TBARS, bem como na diminuição significativa em vários parâmetros inflamatórios analisados. Desta forma, nossa hipótese é que a diminuição de ROS poderia ser uma estratégia importante no controle da resposta inflamatória associada ao GVHD, o que poderia resultar em menor morbidade e mortalidade dos animais. Para confirmar esta hipótese, um experimento foi realizado para analisar a sobrevivência dos animais e os sinais clínicos da GVHD. O grupo controle não desenvolveu a doença e apresentou 100% de sobrevivência até o final do experimento. Em contraste, camundongos do grupo GVHD sem tratamento (veículo) morreram até o décimo sexto dia após o transplante. O bloqueio na atividade da NADPH-oxidase pelo tratamento com apocinina resultou em uma taxa de 70% de sobrevivência (figura 22). Para verificar se o efeito da apocinina observado pela maior taxa de sobrevivência dos camundongos permaneceria após o término do tratamento, em um dos experimentos encerramos o tratamento vinte dias após o transplante e acompanhamos a sobrevivência destes animais por mais dez dias. Não houve mortalidade até o encerramento do experimento, sugerindo assim que o controle inicial da resposta inflamatória através da diminuição de ROS é importante para diminuir a gravidade da GVHD.

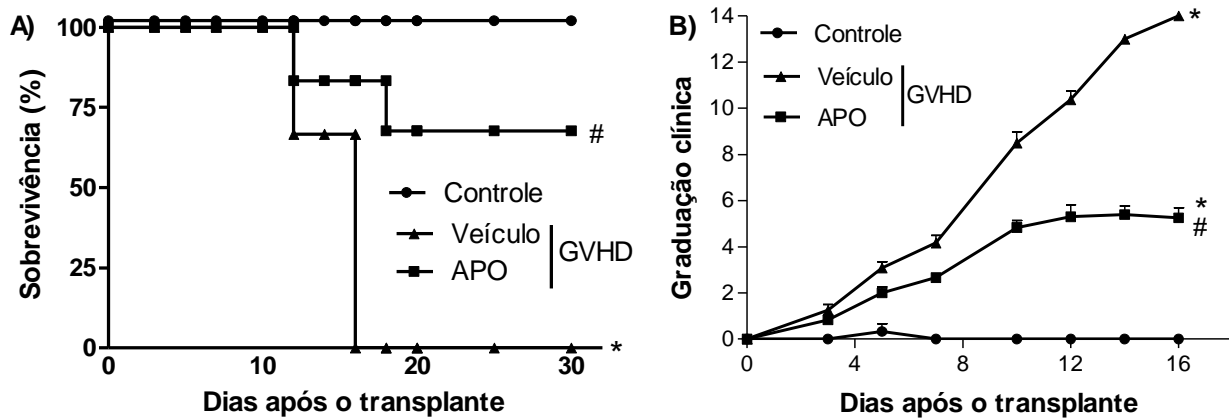


FIGURA 22. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NADPH-OXIDASE, ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM APOCININA, DIMINUIU OS SINAIS CLÍNICOS E A TAXA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS COM GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3×10^7 ESPLÊNOCITOS ADICIONADOS DE 1×10^7 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1, IRRADIADOS COM DOSE DE 9GY. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 02 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESPLÊNOCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E FORAM DENOMINADOS COMO GRUPO CONTROLE. APÓS INDUÇÃO DA GVHD, OS CAMUNDONGOS FORAM MONITORADOS A CADA 2 DIAS PARA ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA (A) E OCORRÊNCIA DOS SINAIS CLÍNICOS DA GVHD (B). RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. * $P < 0.05$ COMPARADO AO CONTROLE $N=4$ e # $P < 0.05$ COMPARADO AO GVHD $N=7$.

5.6) Efeitos do bloqueio farmacológico na atividade do complexo da NADPH oxidase sobre a resposta do enxerto-versus-tumor (GVT)

O próximo passo foi verificar se a modulação da GVHD poderia interferir na resposta do enxerto-versus-tumor. Para tanto, células tumorais P815GFP+ foram injetadas intravenosamente após o transplante de esplenócitos (dia 0) e os camundongos foram monitorados para sobrevivência a cada dois dias (figura 23). Camundongos que receberam apenas células tumorais (grupo P815) apresentaram 100% de letalidade após 24 dias do transplante, confirmando o desenvolvimento do tumor. Os animais que desenvolveram GVHD, e receberam ou não as células tumorais, apresentaram taxa de mortalidade semelhante e 100% dos animais estavam mortos no 35º dia após o transplante. Entretanto, o resultado mais importante desse experimento é que o tratamento com apocinina reduziu a GVHD sem interferir na resposta benéfica do GVHD ao tumor, já que camundongos que desenvolveram o GVHD e foram tratados com apocinina apresentaram mortalidade

semelhante aos animais que desenvolveram GVHD, foram tratados com apocinina e ainda receberam as células tumorais.. O efeito enxerto-versus-tumor parece ter sido mantido. Este grupo manteve esta taxa de sobrevivência até 55 dias após a indução do transplante. Para obtermos uma maior acurácia nas conclusões desses dados, o desenvolvimento do tumor será analisado por citometria de fluxo pela detecção de células P815GFP+ nos linfonodos, sangue e baço dos camundongos, uma vez que a mortalidade pelo GVHD se confunde com a mortalidade pelo tumor no grupo GVHD + P815.

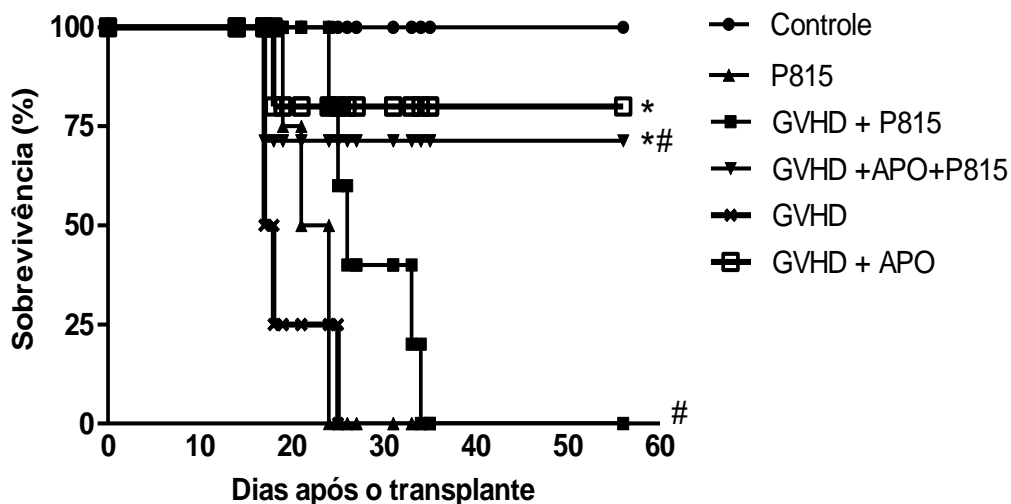


FIGURA 23. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NADPH-OXIDASE EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GVHD NÃO INTERFERE NA RESPOSTA DO ENXERTO-VERSUS-TUMOR. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENICOS C57BL/6J-WT PARA CAMUNDONGOS B6D2F1. CÉLULAS GFP+P815 FORAM INJETADAS I.V EM RECEPTORES B6D2F1 NO DIA 0 DO TRANSPLANTE. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E FORAM DENOMINADOS COMO GRUPO CONTROLE. O GRUPO P815 RECEBEU APENAS CÉLULAS GFP+P815. NO GRUPO GVHD + P815 E GVHD + P815 + APO FOI INDUZIDA À GVHD E TRANSPLANTADAS CÉLULAS TUMORAIS, SENDO QUE CAMUNDONGOS FORAM TRATADOS COM APOCININA (3MG/KG/DIA ATÉ 30 DIAS APÓS O TRANSPLANTE). GRUPOS GVHD E GVHD + APO RECEBERAM ESLENÓCITOS DE DOADORES ALOGENICOS (C57BL/6J), SENDO O ÚLTIMO ACRESCIDO TRATAMENTO COM APOCININA). RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD. O NÚMERO AMOSTRAL FOI DE 7 CAMUNDONGOS POR GRUPO.

5.7) Efeitos da apocinina sobre a reconstituição da medula (“pega do enxerto”)

Com o objetivo de avaliar se a proteção do desenvolvimento do GVHD após o tratamento com apocinina estava ligado à uma interferência na “pega do enxerto”, nós analisamos se as células doadas estavam reconstituindo a medula dos animais receptores da mesma maneira que os animais transplantados e não tratados. Verificou-se que animais receptores da linhagem F1 (H-2^{b+}H-2^{d+}) que receberam células provenientes de camundongos C57 (H-2^{b+}) apresentaram uma porcentagem maior que 85% de células H-2^{b+}

e menor que 15% de células H-2^{d+} em órgãos linfóides (medula e baço), o que demonstra o sucesso da quimera (figura 24 A-E).

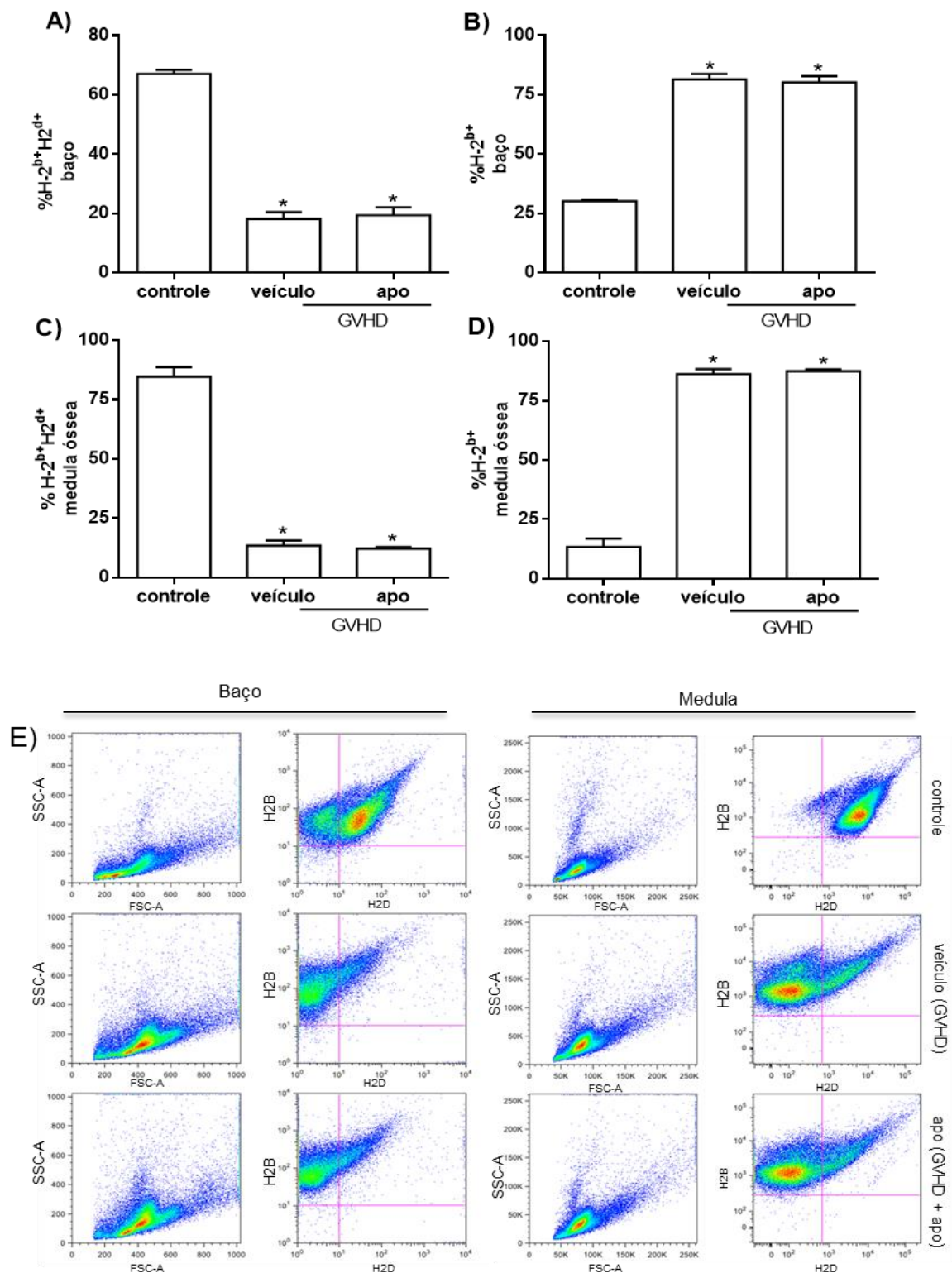


FIGURA 24. RECONSTITUIÇÃO E QUIMERISMO EM CAMUNDONGOS COM GVHD. A GVHD FOI INDUZIDA PELA TRANSFERÊNCIA DE 3X10⁷ ESPLÊNOCITOS E DE 1X10⁷ CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DOADORES SEMIALOGENÉTICOS C57BL/6J-WT (H2B) PARA CAMUNDONGOS B6D2F1 (H2B⁺-H2D⁺), IRRADIADOS COM DOSE DE 9GY. OS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A GVHD FORAM DIVIDIDOS EM 02 GRUPOS: VEÍCULO E APO (GVHD TRATADOS COM

APOCININA: 3MG/KG/DIA), POR VIA INTRAPERITONEAL (I.P), INICIADO 30 MINUTOS ANTES DO TRASPLANTE ATÉ O FINAL DO EXPERIMENTO. CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM ESLENÓCITOS + CÉLULAS MEDULARES DE CAMUNDONGOS SINGÊNICOS (B6D2F1 PARA B6D2F1) NÃO DESENVOLVERAM A DOENÇA E FORAM DENOMINADOS COMO GRUPO CONTROLE. NO DÉCIMO TERCEIRO DIA APÓS O TRANSPLANTE, OS CAMUNDONGOS DOS TRÊS GRUPOS FORAM SACRIFICADOS E A PORCENTAGEM DE ESLENÓCITOS E CÉLULAS DA MEDULA FOI ANALISADA ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO. PORCENTAGEM DE CÉLULAS H2B+-H2D+ NO BAÇO (A), E MEDULA ÓSSEA (C) E PORCENTAGEM DE CÉLULAS H2B+ NO BAÇO (B) E NA MEDULA ÓSSEA (D). EM E GRÁFICOS DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DO EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO REALIZADO. RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA \pm SEM. *P<0.05 COMPARADO AO CONTROLE (N=5) E #P<0.05 COMPARADO AO GVHD (N=5).

DISCUSSÃO

Diversas terapias veem sendo utilizadas no tratamento da GVHD na clínica, entretanto, as drogas utilizadas atualmente apresentam vários efeitos adversos que limitam sua utilização. É bastante usual no tratamento da GVHD o uso de corticosteroides associados à drogas imunossupressoras. Além disso, cerca de 50% dos pacientes tratados com corticosteroides são refratários a estes medicamentos (FERRARA e cols., 2009; CHOI e cols., 2010). A administração endovenosa de ciclosporina A associada ou não ao metrotexato e à prednisona, no dia anterior e até 3 meses após ao transplante, é a profilaxia padrão utilizada atualmente. Mesmo com este tratamento preventivo, aproximadamente 40 a 60% dos pacientes desenvolvem a GVHD (BLAZAR e cols., 2012; CHOI; REDDY, 2014).

Esta doença, ainda sem cura e de difícil controle, está associada a uma resposta inflamatória sistêmica sendo caracterizada pelo aumento do recrutamento e acúmulo de células inflamatórias em órgãos alvo (fígado e intestino) e pela liberação exacerbada de mediadores inflamatórios (FERRARA, 2009). Recentemente, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos que desenvolveram a GVHD apresentaram no fígado, um aumento de espécies reativas de oxigênio (BERNARDES e cols., 2015) (Neste estudo, o tratamento com um nanocomposto que possui propriedade anti-inflamatória e antioxidante minimizou os sinais clínicos da doença, aumentando a sobrevivência dos animais submetidos ao GVHD. Sabe-se que o aumento de ROS está associado ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias, entretanto, sua participação na GVHD, ainda não tinha sido elucidada. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo compreender o papel deste importante mediador inflamatório na doença do enxerto versus hospedeiro e verificar se a interferência farmacológica na produção desse mediador poderia ser uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento ou prevenção desta doença. Aqui, demonstramos que o tratamento com apocinina levou a uma redução nos níveis de ROS em diferentes órgãos envolvidos na patogênese da GVHD – medula óssea, baço e fígado. Esta diminuição esteve associada a uma redução na progressão da doença, morbidade e mortalidade dos animais submetidos ao transplante. Esta conclusão foi apoiada pelos seguintes achados: (1) menor dano hepático e intestinal observado pela menor peroxidação lipídica e danos histológicos; (2) menores níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-17, CCL2, CCL3 e CCL5) associada à redução do acúmulo e

recrutamento de células inflamatórias para o fígado e intestino; (3) menor acúmulo de linfócitos CD8⁺ no fígado, intestino e baço, bem como de CD4⁺ e de macrófagos no tecido hepático destes animais (4) diminuição dos sinais clínicos e diminuição da mortalidade. Ressalta-se ainda, que o bloqueio da atividade da NADPH-oxidase e consequente diminuição na produção de ROS reduziu a resposta inflamatória associada à GVHD, mas (5) não prejudicou a resposta benéfica do enxerto-versus-tumor (GVT).

As espécies reativas de oxigênio são mediadores inflamatórios que quando produzidos em grande quantidade podem levar a uma condição de estresse oxidativo caracterizada por peroxidação lipídica, destruição proteica, morte celular e lesão tecidual (ZHANG e cols., 2011; GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012). Em um estudo sobre estresse oxidativo de células do sangue após o transplante de células hematopoiéticas, Amer e colaboradores (2007) mostraram que células sanguíneas (polimorfonucleares e linfócitos) de animais submetidos ao transplante semi-alogênico apresentavam níveis aumentados de ROS. Sabe-se que em altas concentrações estas moléculas estão 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 celular com consequente lesão de tecidos e órgãos (KOHEN e cols., 2002, REUTER e cols., 2010). Neste trabalho, demonstramos que camundongos submetidos à GVHD apresentaram maiores níveis de ROS associado à peroxidação lipídica em órgãos alvo (fígado e intestino), o que justifica um dano na arquitetura desses órgãos. Diversos pacientes submetidos ao TCH apresentam níveis séricos aumentados de ROS, sendo que este aumento está entre os principais mecanismos que medeiam danos a órgãos, como pulmão e fígado, após o transplante (AMER e cols, 2007). Alguns estudos evidenciaram um aumento de ferro em pacientes submetidos ao TCH. Sabe-se que íons de ferro são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam para catalisar as reações de produção do radical hidroxila (OH•), em uma reação denominada de Haber-Weiss (EVENS, METHA, GORDON, 2004). Este radical é bastante deletério as células, causando danos ao DNA, RNA (ácido ribonucleico), proteínas, lipídios e membranas celulares. Assim, o aumento de ROS e do estresse oxidativo em consequência do TCH pode ser um dos fatores primordiais que levam ao desencadeamento ou agravamento da GVHD (SUH e cols., 2014). De encontro com esses dados, observamos um aumento de ROS em camundongos com GVHD, em 2 fases distintas da doença: início dos sinais (na medula óssea e baço) e da mortalidade (baço e fígado). Um dos mecanismos desencadeadores desta produção inicial de ROS pode estar associado ao regime de

condicionamento (FERRARA e cols., 2009; BLAZAR e cols., 2012). Além disso, o aumento do estresse oxidativo durante a fase efetora da doença poderia estar associada à uma fase de grande produção de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias (PACZESNY e cols., 2009).

Primeiramente demonstramos que a inibição do complexo NADPH-oxidase, através do tratamento com apocinina, levou a diminuição de ROS e da peroxidação lipídica no fígado associada a uma proteção do parênquima hepática. Esta proteção é muito relevante para o controle da GVHD considerando que na clínica metade dos pacientes com a doença apresentam lesão hepática associada com hepatomegalia, níveis anormais de enzimas do fígado no sangue e hiperbilirrubinemia (ROBB, HILL, 2012; TUNCER e cols., 2012). Além disto, danos hepáticos provocados pela doença podem progredir rapidamente para a ductopenia e icterícia profunda (STRASSER e cols., 2000). Já foi demonstrado que as espécies reativas de oxigênio podem contribuir para a morte de hepatócitos, perpetuação da resposta inflamatória crônica e desenvolvimento de fibrinogênese hepática (NOVO; PAROLA, 2008, FRIEDMAN, 2008). Em modelos de isquemia e reperfusão hepática em murinos, em que há aumento de ROS, o uso da apocinina provocou uma diminuição significativa da produção destas moléculas 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 (LIU e cols., 2008). Embora nossos resultados não tenham apontado uma redução de ROS no intestino, foi possível observar que o tratamento com apocinina esteve associado a uma menor lesão intestinal, observada pela redução da graduação histopatológico quando comparado com camundongos com GVHD sem tratamento. Cerca de 50 a 60% dos pacientes com GVHD desenvolvem GVHD intestinal e sua progressão pode afetar todas as seções do intestino e culminar na translocação de bactérias através da parede intestinal lesada. Esta translocação é um importante agravante da GVHD podendo levar à sepse e à morte dos pacientes (JENIFER e cols., 2008, REZENDE e cols., 2014, BERNARDES e cols., 2015). Dessa forma, a inibição deste mediador inflamatório pode ser uma estratégia interessante no controle das lesões hepáticas e intestinais e, conseqüentemente, da GVHD.

Ao analisarmos os níveis de TNF- α e IFN- γ , no fígado e intestino de camundongos com GVHD, observamos que o tratamento com apocinina reduziu os níveis dessa citocinas. 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 (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 à doença do GVHD. O TNF- α participa não só do desencadeamento da doença mas também da progressão da mesma (LEVINE, 2011). Para comprovar a participação desta citocina na GVHD, um estudo comparou os níveis do receptor de TNF- α (TNFR1) sérico de pacientes antes e após o transplante que desenvolveram ou não a GVHD. Durante a primeira semana após o transplante, todos os pacientes apresentaram níveis elevados de TNFR1 como resultado do regime de condicionamento. Entretanto, após este período, os níveis de TNFR1 voltaram para os valores basais em pacientes que não desenvolveram a doença. Pacientes que desenvolveram GVHD apresentaram maiores níveis de TNFR1 no sétimo dia e nos dias subsequentes e tinham uma menor probabilidade de morrerem um ano depois do TCH quando comparados aos que não desenvolveram os sinais clínicos da doença (KITKO e cols., 2008). O aumento de TNF α na GVHD é um fator que também contribui para a perda de peso dos pacientes. O TNF- α , também conhecido por caquexina, está associado à inibição da lipase lipoprotéica, aumentando a lipólise e a depleção de tecido adiposo e muscular em animais e humanos (RUBIN H., 2003, DONOHOE e cols., 2011). Diminuir a produção desta citocina pode ser uma importante estratégia no controle da doença. Um estudo realizado com 61 pacientes com GVHD tratados com corticosteroides e etanercept (fármaco que inibe o TNF α) verificou uma melhora significativa dos sinais e sintomas da doença quando comparado a pacientes tratados apenas com corticosteroides (MACMILLAN e cols., 2002). Sugere-se que produção de TNF- α é mediada pelas ROS, através da regulação positiva da atividade da enzima conversora de TNF (TACE). A TACE é uma enzima responsável pela clivagem do fator de necrose tumoral (TNF) de membrana para a sua forma solúvel (SCOTT e cols., 2011). O TNF- α tem papel de potencializador da atividade da NADPH-oxidase em macrófagos, monócitos e neutrófilos, sendo assim um indutor da produção de ROS (MORGAN e cols., 2008). Assim como o TNF α , o aumento de IFN- γ contribui para o agravamento da GVHD, uma vez que ele provoca danos intestinais seja por efeitos citopáticos diretos da citocina no trato gastrointestinal ou pela ativação de macrófagos que passam a secretar quantidades aumentadas de linfotoxina e TNF- α , potencializando assim o dano ao órgão (ROBB; HILL, 2012).

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com apocinina diminuiu os níveis de IL-17 em órgãos-alvo da doença. A participação da IL-17 e de células denominadas Th17 na fisiopatologia da GVHD veem sendo alvo de alguns estudos (YU e cols., 2011; ANNIEK e cols., 2014). Ao realizar um experimento de GVHD em que células CD4 IL17^{-/-} foram doadas a camundongos selvagens, Kappel e colaboradores (2009) observaram que a deficiência de IL-17 resultou em um atraso no aparecimento dos sinais clínicos da doença. Em 2011, Yu e colaboradores transferiram células T deficientes nos fatores de transcrição T-bet e ROR γ t e mostraram que essas células eram incapazes de se diferenciar em células Th1 e Th17, mas diferenciavam em células Th2 e células T com fenótipos regulatórios (Treg) e isto resultou na melhora do desenvolvimento da GVHD. A diminuição da produção de citocinas pro-inflamatórias pode ser um dos mecanismos associado à melhora do GVHD após o tratamento com apocinina. Entretanto, é importante ressaltar que o presente estudo não explorou os mecanismos pelos quais as ROS interferem na produção de citocinas. Um estudo realizado em humanos submetidos ao TCH demonstrou uma correlação entre aumento dos níveis de ROS e de peroxidação lipídica (mensurada através de F2-urinária isoprostanos) com ativação do fator de transcrição nuclear, o NF-Kappa B (NF-kB) (BLACKWELL e cols., 2000). Este fator de transcrição tem um papel central no controle da inflamação, mediando a expressão de mediadores inflamatórios e citocinas, além de regular a expressão de genes que estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (MORGAN, LIU; 2011). Em um estudo realizado por O'SHAUGHNESSY e colaboradores (2009) a inibição da ativação de NFkB em camundongos com GVHD, através de uma molécula inibidora de IKK, denominada PS1145, resultou em aumento da sobrevivência destes animais, sugerindo deste modo que este fator de transcrição é um regulador crítico no controle da doença. Ao utilizar dois inibidores de NFkB, a PS1145 e o bortezomib, por dois dias após o transplante, Vodanovic e cols (2006) demonstraram que a inibição deste fator resultou em maior proteção dos camundongos submetidos à GVHD. Esta proteção esteve associada à redução nos níveis de IL-2 e TNF- α . É importante ressaltar que o uso do bortezomib por mais de 3 dias resultou na mortalidade dos animais. Em contraste, neste mesmo período, o tratamento com a PS1145 não apresentou toxicidade. Além disso, sabe-se que NF-kB é um ativador de NLRP3 inflamassoma. Em 2013, o papel de NLRP3 na GVHD foi demonstrado pela primeira vez. Em um modelo de GVHD murino a ausência de NLRP3^{-/-} em camundongos receptores ou seu bloqueio farmacológico resultou em menor lesão intestinal e em uma taxa de mortalidade reduzida (JANCOVIC e cols., 2013). Dessa forma, a inibição de NF-kB após o tratamento

com apocinina pode ser um mecanismo associado à diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias e experimentos necessitam ser feitos para esclarecer o papel dessa via em nosso trabalho.

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 (JAKSCH; MATTSSON, 2005, CASTOR e cols., 2012). Em nosso estudo, através de uma análise da microvasculatura intestinal por microscopia intravital observamos que a redução de ROS em camundongos com GVHD tratados com apocinina esteve associada a uma diminuição do rolamento e a adesão de leucócitos no endotélio. Em 2014, Nunes e colaboradores demonstraram que as espécies reativas de oxigênio são importantes mediadores inflamatórios para o recrutamento de leucócitos para os tecidos. Os autores submeteram camundongos à um treinamento físico até a fadiga e ao reduzir os níveis de ROS através do tratamento com apocinina ou pelo uso de camundongos deficientes em gp91phox verificaram uma inibição do recrutamento (rolamento, adesão e transmigração) de leucócitos para o tecido muscular esquelético. A diminuição de ROS esteve associado a uma menor expressão de algumas moléculas de adesão, destacando, assim a importância deste mediador para o recrutamento de leucócitos (NUNES e cols., 2014).

No presente trabalho, verificou-se que camundongos tratados com apocinina apresentaram uma diminuição de CCL3, CCL2 e CCL5 no fígado e intestino quando comparados aos camundongos com GVHD sem tratamento. Diversos autores veem demonstrando que algumas quimiocinas são importantes na participação dos processos de ativação, recrutamento e acúmulo de leucócitos e em consequência à lesão dos órgãos alvos da GVHD (BOUAZZAOUI e cols., 2009; CHOI e cols., 2010). A CCL3 é uma quimiocina importante para o desenvolvimento da doença clínica e terapias baseadas no seu bloqueio mostraram-se eficazes no controle da GVHD em murinos (Castor e cols., 2010). Ao utilizar um tratamento com uma proteína ligante da quimiocina CCL3, denominada evasina-1 em camundongos submetidos à GVHD, Castor e colaboradores (2010) observaram redução do número de leucócitos no intestino, sugerindo que CCL3 desempenha um importante papel na adesão e subsequente recrutamento de células inflamatórias para órgãos alvo. Nossos resultados apontaram uma diminuição de ROS associados a uma redução de CCL3, o que poderia explicar o menor recrutamento e acúmulo de leucócitos observados no intestino e no fígado de camundongos tratados com apocinina, contribuindo assim pelo menor dano

verificado nos tecidos destes camundongos. Além disto, esta redução de CCL3 esteve associada a menores níveis de CCL5 no fígado e intestino de camundongos do grupo APO. De acordo com Marina e cols (2010) a neutralização de CCL3 leva a uma redução dos níveis de CCL5 no intestino de camundongos com GVHD, sugerindo que esta quimiocina pode modular os níveis de CCL5 neste órgão. Camundongos com GVHD apresentam um aumento na expressão do receptor de CCL5 denominado CCR1. Experimentos utilizando células doadoras de camundongos deficientes neste receptor (CCR1^{-/-}) resultaram em uma diminuição dos sinais clínicos da GVHD com menor liberação de TNF α e IFN- γ , menor recrutamento de células inflamatórias para órgãos alvo da doença, aumentando a sobrevivência destes animais (CHOI e cols., 2007). Estes dados reforçam a hipótese de que a diminuição de CCL3 e CCL5, consequência da diminuição de ROS verificados em camundongos tratados com apocinina, poderia contribuir para uma menor produção de TNF α e IFN- γ , observados em nossos experimentos. Além disto, sabe-se que quimiocinas produzidas por células T, como CCL5 e CCL3 aumentam a migração de macrófagos CCR2⁺ para o pulmão levando a maior liberação de TNF α , perpetuando assim a resposta inflamatória (CHOI e cols., 2007, CASTOR e cols., 2012). Na GVHD, a ausência do receptor CCR2 levou a uma menor ativação e migração de células T CD8⁺ no intestino e pulmão dos camundongos (TERWEY e cols., 2005).

Concomitante ao menor recrutamento e adesão de leucócitos também foram observados no presente estudo, uma diminuição do acúmulo de macrófagos e de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em órgãos alvo da doença. As participações destas células no desenvolvimento da GVHD veem sido descrita em diferentes estudos. Os macrófagos participam da patogênese da GVHD, através de sua função fagocitária, da apresentação de antígenos para linfócitos T e da expressão de receptores para citocinas pró-inflamatórias, além de produzir várias citocinas, incluindo TNF- α e mediadores inflamatórios como as espécies reativas de oxigênio (FIEREN, 2012). A ativação e interação das células T doadas com as APC do hospedeiro são essenciais para o desenvolvimento da GVHD. Uma das principais estratégias para profilaxia da GVHD consiste na interferência da função de linfócitos T ou em sua depleção, através da manipulação farmacológica e experimental (CHOI; REDDY, 2014). O dano tecidual causado por linfócitos T citotóxicos induz o recrutamento de outras células efetoras incluindo células NK, macrófagos e neutrófilos que aumentam a lesão tecidual e resultam na perpetuação da GVHD, com lesão de órgãos alvo, podendo levar à morte do hospedeiro (BLAZAR; MURPHY; ABEDI, 2012; CHOI). Desta

maneira, diminuir o recrutamento e acúmulo destas células em órgãos alvo torna-se uma maneira importante de controlar o desenvolvimento e agravamento da doença.

A capacidade das células T doadas infundidas em pacientes que submeteram ao transplante de células hematopoiéticas em reagir contra a doença remanescente é denominada de enxerto versus tumor (GVT) ou enxerto versus leucemia (GVL). É importante ressaltar que o tratamento na GVHD deve ser eficiente em diminuir a intensidade da doença sem interferir na capacidade destas células em desenvolver uma resposta eficiente contra o tumor (GVT) (KOLB e cols., 2008). Diversas terapias visando à prevenção da GVHD resultam na diminuição do efeito GVT, o que inviabiliza suas aplicações efetivas (MATEJKOVA e cols., 2008, LI e cols., 2009). Sabendo que o tratamento com apocinina levou a uma diminuição de ROS e em consequência a menor gravidade da GVHD, nosso próximo passo foi analisar se este efeito benéfico contra à doença poderia interferir na resposta contra o tumor. A diminuição de ROS observada em nosso trabalho foi eficaz em reduzir, mas não abolir a doença, comprovado pela ocorrência de alguns sinais clínicos da GVHD nos animais tratados. Após aproximadamente seis dias do transplante, observou-se que animais tratados com apocinina 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. Além disto, a diminuição de ROS no fígado (órgão alvo importante da GVHD) e dos níveis de TBARS (indicador da peroxidação lipídica) apresentaram diminuídos após 13 dias do transplante. Isto demonstrou que a apocinina agiu principalmente na fase efetora da resposta imune e desta maneira não afetou a capacidade para induzir a resposta GVT, podendo ser uma estratégia importante no controle da doença.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram que as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel pró-inflamatório levando a uma amplificação e não resolução da doença do enxerto contra hospedeiro. De maneira importante, o tratamento com apocinina resultou em aumento da sobrevida e diminuição dos sinais clínicos associados à doença, sem interferir no efeito GVT. Assim, considerando os efeitos benéficos associados à diminuição da produção de ROS na GVHD, o uso de antioxidantes poderia ser uma estratégia promissora a ser utilizada no tratamento da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, RME; NOGUEIRA, AMMF. Distribution of enteroglucagon-and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res*, v. 290, p. 61-69, 1997.
- 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.58–64, 2008.
- BARNES, DW; LOUTIT, JF; MICLEN, HS. “Secondary disease” of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann. NY acad. Sci*, v.99, p.374-385, 1962.
- BEDARD, K; KARUSE, KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, v. 87, p.245-313, 2007.
- BERNARDES, PT; REZENDE, BM; RESENDE, CB; DE PAULA, T; REIS, AC; GONÇALVES, WA; VIEIRA, EG; PINHEIRO, MV; SOUZA, DG; CASTOR, MGM, TEIXEIRA, MM; PINHOV. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. *Plos One*, v. 4, p. 1-16, 2015.
- BLAZAR, BR; MURPHY, WJ; ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology*, v.12, p. 443 458, 2012.
- BOUAZZAOU, 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, p.10687-701, 2009.

CAMPS, J; GARCIA-HEREDÍA, A. Introduction: Oxidation and Inflammation, A Molecular Link Between Non-communicable Diseases. *Adv Exp Med Biol.*, v. 824, p.1-4, 2014.

CATLEY L, ANDERSON K. Strategies to improve the outcome of stem cell transplantation in multiple myeloma. *Hematol J*, v.5, p.9-23, 2004.

CASTOR, MG; REZENDE, B; RESENDE, CB; ALESSANDRI, A L; FAGUNDES, CT; SOUSA, LP; ARANTES, RM; SOUZA, DG; SILVA, TA; PROUDFOOT, AE; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. The CCL3/macrophage inflammatory protein-1-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. *J. Immunol*, 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.

CASTOR, MGM; REZENDE, BM; RESENDE, CB; BERNARDES, PTT, CISALPINO, D; VIEIRA, AT; SOUZA, DG; SILVA, TA; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. *Journal of Leukocyte Biology*, v.91, p. 629-639, 2012.

CASTOR, MGM.; PINHO, V; TEIXEIRA, MM. The Role of Chemokines in Mediating Graft Versus Host Disease: Opportunities for Novel Therapeutics. *Front Pharmacol.* 2012; v.3, p. 3-23, 2012.

CHEUK, DKL. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant*, v.3, p. 99-112, 2013.

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 SW, REDDY P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease (2014). *Nat Rev Clin Oncol.* 11(9):536-47, 2014.

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.

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*, v.373, p. 1550-61, 2009.

FREITAS, M; GOMES, A; PORTO, G; FERNANDES, E. Nickel induces oxidative burst, NF- κ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 15, pág. 1275–1283, 2010.

GOMES, EC; SILVA, AN; OLIVEIRA, MR. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p. 1-12, 2012.

GUGLIUCCI, A; MENINI, T. The Axis AGE-RAGE-Soluble RAGE and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol*, v.824, p.191-208, 2014.

HARRIS, AC; FERRARA, JLM; LEVINE, JE. Advances in predicting acute GVHD. *British Journal of Haematology*, v.160, p. 288-302, 2013.

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

HOLTANI, SG; PASQUINI, M; WEISDORF, DJ. Acute GVHD: A bench to bedside update. *Blood*, v.124, 2014.

HOROWITZ MM, GALE RP, SONDEL PM, GOLDMAN JM, KERSEY J, KOLB HJ, RIMM AA, RINGDEN O, ROZAMAN C, SPECK B, TRUITT RL, ZWAAN FE, BORTIN MM. Graft versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, v.75, p.555-561, 1990.

JAKSCH M., MATTSSON J. The pathophysiology of graft-versus-host disease.

Scand J Immunol, v. 61, p. 398-409, 2005.

JAGASIA, M; ARORA, M; FLOWERS, ME; CHAO, NJ; MCCARTHY, PL; CUTLER, CS; URBANO-ISPIZUA, A; PAVLETIC, SZ; HAAGENSON, MD; ZHANG, MJ; ANTIN, JH; BOLWELL, BJ; BREDESON, C; CAHN, JY; CAIRO, M; GALE, RP; GUPTA, V; LEE, SJ; LITZOW, M; WEISDORF, DJ; HOROWITZ, MM; HAHN, T. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*, v.119, p. 296–307, 2012.

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.

KITKO CL, PACZESNY S, YANIK G, BRAUN T, JONES D, WHITFIELD J, CHOI SW, HUTCHINSON RJ, FERRARA JL, LEVINE JE. Plasma elevations of tumor necrosis factor-receptor-1 at day 7 postalloeneic transplant correlate with graft-versus-host disease severity and overall survival in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transpl*. v.14, p.59–765, 2008.

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.

LI, J.M., GIVER, C.R., LU, Y., HOSSAIN, M.S., AKHTARI, M., WALLER, E.K. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy*. V.4, P.599-621, 2009.

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.

LOPES, F ; COELHO, FM. ; COSTA, VV. ; VIEIRA, ELM. ; SOUSA, LP. ; SILVA, TA. ; VIEIRA, LQ. ; TEIXEIRA, MM. ; PINHO. Hydrogen peroxide resolves neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis and Rheumatism*, v.63, p.2651-2660, 2011.

MORGAN, MJ; LIU, ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, v. 21, p.103-115, 2011.

NAIK, E; DIXIT, VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.* V. 208. P. 417-420, 2011.

NUNES, AS; BERNARDES, PTT; REZENDE, BM; LOPES, F; GOMES, EC; MARQUES, PE; LIMA, PMA; COIMBRA, CC; MENEZES, GB; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. Treadmill Exercise Induces Neutrophil Recruitment into Muscle Tissue in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. An Intravital Microscopy Study. *Plos One*, v. 9, p. 1-11, 2014.

Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG e cols. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 113: 273–278, 2009.

PACZESNY S; HANAUER D, SUN Y; REDDY P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplantation*, v. 45, p. 1–11, 2010.

PATERNITI, I; GALUPPO, M; MAZZON, E; IMPELLIZZERI, D; ESPOSITO, E; BRAMANTI, P; CUZZOCREA, S; LEUKOC, J. Protective effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase activity, in splanchic artery occlusion and reperfusion. *Biology*, v.88, p.993- 1003, 2010.

PETERSDORF, EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *BLOOD*, v.122, p.1863-1872, 2013.

PIDALA, J; SARWAL, M; ROEDDER, S; LEE, SJ. Biologic markers of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*, v.49, p.324-31, 2014.

POHANKA M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem*, v.21, p. 356-64, 2013.

QIAN, L; SHEN, J. Hydrogen therapy may be an effective and specific novel treatment for Acute Graft-versus-host disease (GVHD). *J. Cell. Mol. Med*, v. 17, p. 1059-1063, 2013.

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.

REZENDE, BM. Lithothamnion muelleri regula a resposta inflamatória, lesão de órgãos alvo e letalidade na doença do enxerto versus hospedeiro. 2012. 19f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

REZENDE, BM; BERNARDES, PTT; RESENDE, CB; ARANTES, RME; SOUZA, DG; BRAGA, FC; CASTOR, MGM; TEIXEIRA, MM; PINHO, V. Lithothamnion muelleri Controls Inflammatory Responses, Target Organ Injury and Lethality Associated with Graft-versus-Host Disease in Mice. *Mar. Drugs*, v. 11 p. 2595-2615, 2013.

ROBB, RJ; HILL, GR. The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation. *Blood*, v.119, p. 5351-5358, 2012.

SABUNCUOGLU, S; KUŞKONMAZ, B; ÇETINKAYA, DU; ÖZGÜNEŞ, H. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients. *Bone Marrow Transplantation*, v. 47, p. 651–656, 2012.

SHLOMCHIK, WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. v.7, p.340-52, 2007.

SIMONS, JM., HART, BA., IP VAI CHING, TR., VAN DIJK, H., LABADIE, RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 8, p.251-258, 1990.

SPIERINGS, E; KIM, YH; HENDRIKS, M; BORST, E; SERGEANT, R; CANOSSI, A; OUDSHOORN, M; LOISEAU, P; DOLSTRA, H; MARKIEWICZ, M; LEFFELL, MS; PEREIRA, N; KIRCHER, B; TURPEINEN, H; ELIAOU, JF; GERVAIS, T; LAURIN, D, ENCZMANN J, MARTINETTI M, THOMSON J, OGUZ F, SANTARONE S; PARTANEN, J; SIEKIERA, U; ALESSANDRINO. EP; KALAYOGLU, S; BRAND R; GOULMY, E. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, v.19, p.1244-1253, 2013.

SRIVASTAVA N, GONUGUNTA VK, PULI MR, RAGHAVENDRA AS. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta*, v. 229, p. 757-765, 2009.

STEFANSKA J, PAWLICZAK R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm*, v. 2008, p. 1-10, 2008.

SUH, JH; KANATHEZHATH, B; SWAPNA, S; GUO, J; ZHOU, A; TIWANA, A; KUYPERS, F; AMES, BN; WALTERS, MC. Thiol/Redox Metabolomic Profiling Implicates GSH Dysregulation in Early Experimental Graft versus Host Disease (GVHD). *PLOS ONE*, v. 9, p. 1-14, 2014.

TANG, LL; YE, K; YANG, FX; ZHENG, JS. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *Journal of International Medical Research*, v.35, p.517-522, 2007.

TERWEY, T. H., KIM, T. D., KOCHMAN, A. A., HUBBARD, V. M., LU, S., AND ZAKRZEWSKI, J. L. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*, v.106, 3322–3330, 2005.

VALKO, M; LEIBFRITZ, D; MONCOL, J; CRONIN, MT; MAZUR, M; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v.39, p.44-84, 2007.

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

WALLWORK CJ, PARKS DA, SCHMID-SCHÖNBEIN GW. Xanthine oxidase activity in the dexamethasone-induced hypertensive rat. Microvasc Res, v.66, p.30-7, 2003.

ZHANG, Y; DU, Y; LE, W; WANG, K; KIEFFER, N; ZHANG, J. Redox control of the survival of healthy and diseased cells. Antioxid. Redox Signal, v.15, p. 2867–2908, 2011.

ZHOU, F; SHEN, Q; CLARET, FX. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Journal of Leukocyte Biology. V. 94, p. 423 -429, 2013.

ANEXO 1

Artigo publicado na revista Plos One: Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects