LAYRA LUCY MARIA ALBUQUERQUE
DA COSTA

ESTUDO DOS GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA MIELOPOESE EM MODELO MURINO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

LAYRA LUCY MARIA ALBUQUERQUE DA COSTA

ESTUDO DOS GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA MIELOPOESE EM MODELO MURINO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Layra Lucy Maria Albuquerque da.
Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese em modelo murino de resposta inflamatória aguda / Layra Lucy Maria Albuquerque da Costa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Resposta inflamatória.

Versão do título para o inglês: Study of genes and proteins involved in the regulation of myelopoiesis in a murine model of acute inflammatory response.

1. Medula Óssea 2. Inflamação 3. Neutrófilos 4. Camundongos
I. Filho, Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0126/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Layra Lucy Maria Albuquerque da Costa.

Título da Tese: Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese em modelo murino de resposta inflamatória aguda.

Orientador(a): Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **95** nas fls. **73** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese in vitro em modelos murino de resposta inflamatória aguda** do qual participou(aram) o(s) alunos **Layra Lacy Maria Albuquerque da Costa, Iana Suly Santos Katz e os pesquisadores Olga Célia Martinez, Marcelo De Franco, Nancy Starobinas,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **09.10.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 14 de outubro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 011.13

São Paulo, 05 de março de 2013.

REF.: Protocolo nº 95/09.

"Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese in vitro em modelos murino de resposta inflamatória aguda"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 14.10.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.
Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À minha mãe, *Maria Albuquerque* (*em memória*).

Porque sonhastes meus sonhos e me amastes com teu infinito amor,

dedico a ti a realização do nosso sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador,

Pela confiança e oportunidade que me foi dada. Você me segurou pela mão e me ensinou os primeiros passos da minha vida científica. Obrigada por todo ensinamento, pelo incentivo e força ao longo de toda esta caminhada. Hoje me sinto forte e segura para a próxima caminhada e você é e foi parte fundamental deste processo.

Aos pesquisadores do laboratório de Imunogenética,

Dra. Olga Ibañez, Dra. Wafa Cabrera, Dr. Marcelo De Franco, Dra. Nancy Starobinas, Dra. Andrea Borrego, Dr. José Ricardo, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Solange Massa, Dra. Milene De Franco, Dra. Solange Carbonare e Dra. Aryene Trezena, pela colaboração com este trabalho, pelo incentivo e contribuição intelectual.

Aos meus amigos do laboratório de Imunogenética,

"A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens (François La Rochefoucauld)."
À Iana, Alessandra e Camila por estarem sempre prontas a ajudar nos experimentos e discutir os resultados. À Tatiane, Lilian, Aline, Jussara, Fernanda, Cristiano, Mariana, Mara, Marcela, Renata, Francisca,Vinícius, Luciana, Patrícia, Roberta, Pricilia, Priscila, Thaís e Débora. Minha enorme gratidão a todos vocês pela ajuda, pela convivência maravilhosa e pela amizade.

Aos funcionários do laboratório de Imunogenética,

Sandra Ottoboni, Neusa Miranda, Andressa Rogge, Mara Irineu, Marinalva Lima, Tânia, Ronaldo, Aline, Celso, Gustavo e Cleonice pelo agradável convívio, pela preparação de todos os materiais utilizados e cuidados dos animais.

Às doutoras membros da minha banca qualificação,

Dra. Sônia Jancar, Dra. Eliana Faquim e Dra. Juciane Castro pela contribuição intelectual, direcionamento e excelente conversa sobre este projeto e andamento deste trabalho científico. Muito obrigada!!!

Aos colaboradores desse projeto,

Dra. Carla Lima e Lidiane Grund. E também a professora Primavera, Graziela e Karina Nakajima por serem sempre solícitas e dispostas a sanar minhas dúvidas de protocolos.

Ao meu pai,

Manoel Graciano da Costa e sua esposa Luciete pelo amor, carinho e apoio.

Á minha mãe (em memória),

Pela confiança, respeito e amor que sempre deu aos seus filhos. Por ter feito todos os esforços possíveis para que eu pudesse realizar os meus sonhos profissionais. Não existem palavras para descrever a sua importância nas decisões da minha vida. Seu exemplo e sua determinação me fizeram forte e capaz de lutar pelos meus ideais.

Aos meus irmãos,

Aos maiores, William e Lair, pelo amor, paciência, carinho e pelo enorme apoio. Vocês são a minha luz. E aos irmãos menores, Manuela e Vítor, por serem uns anjinhos. Obrigado pelo interminável incentivo, apoio e principalmente pelo amor que me dá forças para continuar.

Ao meu namorado,

Rodolfo Favaro pelo companheirismo. Por todo o apoio científico, pelo incentivo ao meu crescimento profissional e por todas as horas e madrugadas que passastes ao meu lado, firme e forte, me ajudando neste trabalho. Ao seu lado sei que posso sonhar mais alto.

Á minha família,

"Não há dúvida de que é junto da família e do lar que todas as maiores virtudes, as virtudes mais dominantes da sociedade humana, são criadas, fortalecidas e mantidas (Winston Churchill)."

Ás minhas amigas,

Alessandra Suppa, Silmara Figueiró, Tatiane Canhamero, Iana Katz, Roberta Carneiro, Lilian Carvalho, Priscila Leal Fernanda Ampessan, Angela Moreira e Greiciane Paim pela amizade imprescindível e fundamental à vida.

"Como pode o navio cortar as ondas se elas são muitas e o navio um só? A razão é que o navio tem um propósito".

Winston Churchill.

"A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelos quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará para nós".

A. J Cronin

RESUMO

ALBUQUERQUE, L. L. **Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese em modelo murino de resposta inflamatória aguda.** 2013. 166 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Camundongos geneticamente selecionados para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda (AIR) exibem diferenças significativas quanto ao número médio de neutrófilos migrantes e ao conteúdo proteico do exudato inflamatório em resposta a partículas de poliacrilamida (Biogel). Um dos fatores determinantes da maior capacidade inflamatória da linhagem AIRmax, que chega a ser de 20 vezes, é a maior produção de neutrófilos pela medula óssea (MO) destes animais. Em conseqüência de um estímulo inflamatório, o sistema hematopoético acelera a expansão dos progenitores mielóides aumentando a produção de granulócitos, fenômeno denominado de mielopoese emergencial. No presente estudo nos propusemos a avaliar os fatores celulares e moleculares que conferem diferente potencial hematopoético entre as linhagens AIRmax e AIRmin e a associação destes com a intensidade da AIR. Para tanto, os animais foram avaliados em condições basais e em diferentes períodos de tempo (1,5, 3, 6, 12 e 24 h) após o estímulo inflamatório com o Biogel P-100®. Assim, avaliamos: *1)* a celularidade da MO por contagem total de leucócitos; *2)* a produção de citocinas no exudato e soro detectadas por microesferas magnéticas; *3) a* expansão de progenitores mielóides por citometria de fluxo; *4)* o potencial proliferativo das células da MO *in vitro; 5)* a expressão gênica e proteica de receptores de citocinas hematopoéticas, por PCR em tempo real (qPCR) e citometria de fluxo, respectivamente e *6) a* expressão de fatores de transcrição por qPCR. Nossos resultados demonstraram que apenas os animais AIRmax possuem a capacidade de desenvolver uma mielopoese emergencial induzida pelo Biogel, resultados estes confirmados pelo aumento significativo dos leucócitos totais, produção local de G-CSF e quimicionas atraentes de neutrófilos nas primeiras horas da indução da AIR, expansão de progenitores mielóides comuns (CMP) na MO seguido pelo aumento de granulócitos em várias fases de diferenciação. Por outro lado, nos animais AIRmin, nenhum desses parâmetros foram alterados quando comparados à condição basal. Desta forma, concluímos que a capacidade dos animais AIRmax de desenvolver uma alta AIR, em relação aos animais AIRmin, esta associada com o potencial de expansão das células progenitoras mielóides, que por sua vez, pode ser determinada pelos fatores solúveis locais produzidos nas primeiras horas da inflamação.

Palavras-chave: Mielopoese. Inflamação. Fatores estimuladores de colônias. Medula óssea.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, L. L. **Study of genes and proteins involved in the regulation of myelopoiesis in a murine model of acute inflammatory response.** 2013. 166 p. Ph. D thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mice genetically selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory response (AIR) exhibit significant differences in the average number of migrant neutrophils and in the protein content of the inflammatory exudate in response to polyacrylamide beads (Biogel). One of the major factors of the higher inflammatory capacity of AIRmax mice, which reach 20-fold difference, is the larger production of neutrophils by the bone marrow (BM). As a result of an inflammatory stimulus, the hematopoietic system accelerates the expansion of myeloid progenitors by increasing the production of granulocytes, a phenomenon called emergency myelopoiesis. In the present study we set out to evaluate the cellular and molecular factors that confer hematopoietic potential difference between AIRmax and AIRmin mice and their association with the intensity of AIR. For this purpose, the animals were assessed at steady-state and at different time periods (1.5, 3, 6, 12 and 24 h) after stimulation with Biogel P-100®. We evaluated: 1) the BM cellularity by total leukocyte count, 2) cytokine production in the serum exudate detected by magnetic microspheres, 3) the expansion of myeloid progenitors by flow cytometry assay, 4) the *in vitro* BM proliferation, 5) gene and protein expression of hematopoietic cytokine receptors by real-time PCR (qPCR) and flow cytometry, respectively, and 6) the expression of transcription factors by qPCR. Our results show that only AIRmax mice presented the ability to develop an emergency myelopoiesis induced by Biogel. These results were confirmed by the significant increase of total leukocytes, local G-CSF and chemokines production in the first 3 hours of AIR induction, expansion of common myeloid progenitors (CMP) followed by BM granulocytes differentiation at various stages of development. On the other hand, in AIRmin mice, any of these phenotypes were altered when compared to steady-state conditions. Thus, we conclude that the ability of the AIRmax mice to develop a higher AIR, compared to AIRmin mice, is associated to the myeloid progenitor cells expansion, which in turn might be determined by the local soluble factors produced during the first hours of inflammation.

Keywords: Myelopoiesis. Inflammation. Colony-stimulating factors. Bone marrow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Demonstração esquemática da população F0 nas linhagens AIR.....24

Figura 2 – Divergência entre as linhagens AIRmax e AIRmin.....25

Figura 3 – Processo esquemático de adesão e migração transendotelial.....29

Figura 4 – Arquitetura da Medula Óssea em corte transversal do fêmur de camundongos.....33

Figura 5 – As HSCs originam todas as linhagens de células sanguíneas.....34

Figura 6 – Modelos de divisão das células – tronco hematopoéticas.....35

Figura 7 – Infiltrado leucocitário no sítio de injeção de Biogel P-100®.....72

Figura 8 – Citocinas e fatores de crescimento hematopoético no exudato em períodos variados após a injeção s.c de Biogel P-100®.....76

Figura 9 – Quimiocinas no exudato.....77

Figura 10 – Leucócitos na circulação.....80

Figura 11 – Eritrócitos na circulação.....82

Figura 12 – Citocinas, fatores de crescimento hematopoético e quimiocinas no soro.....84

Figura 13 – Células totais na medula óssea.....86

Figura 14 – Granulócitos na medula óssea.....89

Figura 15 – Neutrófilos maduros na medula óssea.....90

Figura 16 – Linfócitos na medula óssea.....92

Figura 17 – Representação da caracterização de células progenitoras mielóides na medula óssea.....96

Figura 18 – Caracterização de células progenitoras na medula óssea.....97

Figura 19 – Expressão dos receptores de superfície celular GM-CSFRβ e IL-3R nas HSPCs.....101

Figura 20 – Expressão da molécula CD131 nas células progenitoras (Lin negativas) da medula óssea.....102

Figura 21 – Expressão da molécula CD123 nas células progenitoras (Lin negativas) da medula óssea.....103

Figura 22 – Expressão de receptores de citocinas hematopoéticas nas células progenitoras da medula óssea.....105

Figura 23 – Expressão de fatores de transcrição nas células progenitoras da medula óssea.....108

Figura 24 – Expressão dos receptores de superfície celular GM-CSFRβ e IL-3R.....111

Figura 25 – Expressão gênica das células totais da medula óssea.....113

Figura 26 – Ensaio clonogênico das células totais da MO.....116

Figura 27 – Resposta diferencial *in vitro* à citocinas hematopoéticas.....121

Figura 28 – Cinética de proliferação *in vitro das* células da medula óssea à citocinas hematopoéticas.....122

Figura 29 – Caracterização de granulócitos e receptores de citocinas hematopoéticas nas células da medula óssea estimuladas *in vitro*.....123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citocinas e.fatores estimuladores de crescimento celular.....50

Tabela 2 – Sequência dos primers utilizados nas reações de.....66

Tabela 3 – Porcentagem de leucócitos na circulação por contagem diferencial.....81

Tabela 4 – Porcentagem das populações de HSPCs na medula óssea durante a resposta inflamatória aguda.....98

Tabela 5 – Porcentagem de células progenitoras (HSPCs) $CD131^{+}CD123^{neg}$ e $CD131^{+}CD123^{+}$ na MO durante a resposta inflamatória aguda.....100

Tabela 6 – Porcentagem de células da MO $CD131^{+}CD123^{neg}$ e $CD131^{+}CD123^{+}$ na MO durante a resposta inflamatória aguda.....110

Tabela 7 – Proliferação das células da medula óssea em resposta a diferentes combinações de fatores de crescimento.....120

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados da indução da resposta inflamatória aguda.....158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR – Resposta inflamatória aguda

APC – Aloficocianina

ATRA – Ácido Retinóico all trans

cDNA – DNA complementar

C/EBP – (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*)

CLP – (*Common Lymphoid Progenitors)*

CMP – (*Common Myeloid Progenitors*)

CSF – Fator estimulador de colônias

CXCL12 – quimiocina 12 ligante de motivos CXC (SDF-1α)

DMBA – 7,12 – dimetilbenzatraceno

FITC – (*Fluorescein Isothiocyanate*)

GMP – (*Granulocyte-macrophage progenitor*)

G-CSF – fator estimulante de crescimento de granulócitos

G-CSFR – Receptor do fator estimulante de crescimento de granulócitos

GM-CSF – fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos

GM-CSFR – Receptor do fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos

HSC – Célula -tronco hematopoética

HSPC – Célula-tronco e progenitora hematopoética

ICAM1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFN-γ – Interferon gama

IL-3Rα – Receptor α da interleucina 3

IPG – (*Immobilized pH gradient*)

JAM1 – Molécula de adesão juncional

JAK – Janus quinase

LFA1 – Antígeno 1 associado a função dos linfócitos

LMMJ – Leucemia mielomonocítica juvenil

LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica

LT- HSC – Célula-tronco de vida longa

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

MB – Mieloblastos

MC – Mielócitos

MCP-1 – (*Monocyte chemoattractant Protein*- 1)

MCP-2 – (*Monocyte chemoattractant Protein*- 2)

M-CSF – fator estimulante de crescimento de macrófagos

M-CSFR – Receptor do fator estimulante de crescimento de macrófagos

MEP – (*Megakaryocyte-erytroid progenitors*)

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1α – (*Macrophage Inhibitory protein - 1α)*

MMP-8 – Matrix Metaloproteinase - 8

MMP-9 – Matrix Metaloproteinase – 9

MMP-25 – Matrix Metaloproteinase - 25

MO – Medula Óssea

MPO – Mieloperoxidase

MPP – Progenitor Multipotente

NE – elastase de neutrófilos

NK – Células matadoras naturais (*Natural Killer*)

PAMP – Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PECAM1 – Molécula de adesão à células endoteliais e plaquetas 1

PM – Promielócitos

PMN – Polimorfonucleares

PRR – Receptores de Reconhecimento Padrão

PSGL1 – Glicoproteína ligante de Selectina 1

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

QTL – (*Quantitativ Trait Loci*)

RARs – Receptores de ácido retinóico

RARE – Elemento responsivo ao ácido retinóico

RNAm – RNA mensageiro

ROS – Espécies Reativas do Oxigênio

RXRs – Receptores X retinóicos

SCF – Fator de célula –tronco

SDF1α – Fator derivado de células estromais 1α

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

ST- HSC – Célula-tronco de vida curta

STAT – Sinais ativadores e transdutores de transcrição

TBE – Tampão Brometo de Etídeo

TGF-β – Fator de crescimento tumoral

TH17 – Linfócito T auxiliador 17

TLR – Receptores do tipo Toll

TPA – 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

TPO – Trombopoietina

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 Linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda 23
1.2 Resposta Inflamatória aguda 27
1.2.1 Neutrófilos 30
1.3 Hematopoese 31
1.3.1 Células-tronco hematopoéticas 33
1.3.1.1 Retenção/mobilização das HSPCs na medula óssea *36*
1.3.2 Granulopoese 38
1.3.2.1 Granulopoese emergencial 40
1.3.2.2 Papel do ácido retinóico na diferenciação granulocítica 41
1.3.3 Fator estimulador de colônias (CSFs) e seus receptores 42
1.3.3.1 Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) 43
1.3.3.2 Fator estimulador de colônias de granulócitos de macrófagos (GM-CSF) 44
1.3.3.3 Fator estimulador de colônias multilinhagens (IL-3) 45
1.3.4 Fatores de transcrição na hematopoese 46
1.3.5 Modelos instrutivos e permissivos na hematopoese 48
2 OBJETIVOS *55*
2.1 Objetivo geral *56*
2.2 Estratégias experimentais *56*
3 MATERIAL E MÉTODOS 57
3.1 Camundongos 58
3.2 Preparo do Biogel P-100® 58
3.3 Indução e avaliação da resposta inflamatória aguda 58
3.4 Obtenção de células do sangue e da medula óssea 59
3.5 Dosagem das citocinasdo exudato e soro 59
3.6 Contagem diferencial dos leucócitos 60
3.7 Separação de células $CD5^+CD45R^+(B220)CD11b^+GR1^+Ter\text{-}119^+CD3^+$ da medula óssea (Depleção Negativa) 61
3.8 Citometria de fluxo 61
3.9 Cultura das células da medula óssea em metilcelulose e meio líquido 62
3.10 Extração de RNA 63

3.11 Obtenção do DNA complementar (cDNA) 63
3.12 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo Real.....64
3.13 Cálculo da expressão relativa 64
3.14 Quantificação do conteúdo protéico total das células da medula óssea. 66
3.15 Análise de proteínas em gel SDS-PAGE de duas dimensões (2D). 67
3.16 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata 67
3.17 Análise Estatística 68
4 RESULTADOS 69
4.1 Avaliação da resposta inflamatória aguda após injeção subcutânea de Biogel P-100® 70
4.2 Quantificação de citocinas, fatores de crescimento e quimicionas no exudato. 73
4.3 Celularidade no sangue periférico na resposta inflamatória aguda..... .78
4.4 Dosagem de citocinas, fatores de crescimento e quimicionas na vigência da resposta inflamatória aguda. 82
4.5 Caracterização ex vivo das células da MO durante a resposta inflamatória induzida pelo Biogel P-100® 85
4.6 Granulopoese 87
4.7 Linfopoese 91
4.8 Avaliação de células – tronco e células progenitoras hematopoéticas (HSPCs) na resposta inflamatória aguda 93
4.9 Avaliação da cadeia β do receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 e da cadeia α do receptor de IL-3 nas HSPCs na resposta inflamatória aguda 99
4.10 Expressão de genes reguladores da mielopoese nas HSPCs durante a resposta inflamatória aguda 104
4.10.1 Fatores estimuladores de crescimento 104
4.10.2 Fatores de transcrição 106
4.11 Avaliação da cadeia β do receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 e da cadeia α da receptor de IL-3 nas células totais da MO na vigência da resposta inflamatória aguda 109
4.12 Expressão gênica dos fatores de transcição e da molécula DPP4 nas células da medula óssea na vigência da resposta inflamatória aguda 112
4.13 Resposta proliferativa in vitro das células da medula óssea em resposta a diferentes fatores de crescimento associados ou não ao ácido retinóico .. 114

4.13.1 Ensaio clonogênico 114
5 DISCUSSÃO..... 124
6 CONCLUSÕES..... 138
REFERÊNCIAS 140
ANEXO A – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da resposta inflamatória aguda 157
ANEXO B – Eletroforetrograma em duas dimensões das células da MO na vigência da resposta inflamatória aguda 164

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune inato desempenha um papel essencial na regulação de todos os aspectos da imunidade, visto que a inibição ou eliminação de qualquer um dos vários processos da resposta imune inata aumenta a susceptibilidade a infecções, mesmo quando o sistema imune adaptativo permanece intacto e funcional. Os polimorfonucleares (PMN), macrófagos e células matadoras naturais (NK) são as principais células efetoras desta resposta, sendo os PMN-neutrófilos as células que constituem a primeira linha de defesa em situações agudas como nas reações inflamatórias (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

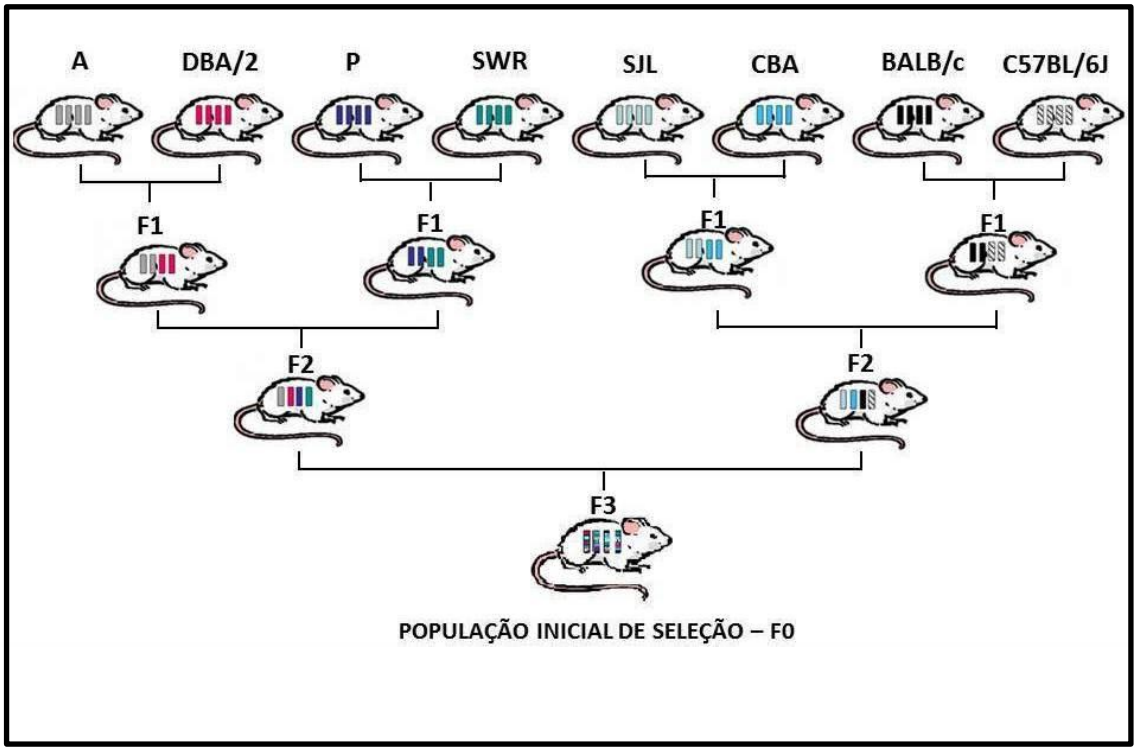
O desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda (AIR) eficaz depende da reposição das células que compõem o sistema imune inato por meio da expansão e diferenciação das células-tronco e progenitoras hematopoéticas – HSPCs (Do inglês: [Hematopoietic/Stem progenitor cells]). A importância da comunicação entre estes dois processos mostra-se pelo fato de que a AIR afeta diretamente o sistema hematopoético e vice-versa. Ambos os processos, por sua vez, demonstram uma variabilidade genética em linhagens isogênicas de camundongos e na população humana (STIFFEL et al., 1990; Revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012; VIETINGHOFF; LEY, 2008).

1.1 Linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda

Os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética com o objetivo de estudar genes e localizações cromossômicas (QTLs) responsáveis pelo controle da reatividade inflamatória aguda desenvolveram, há vários anos, duas linhagens de camundongos heterogêneas que diferem grandemente na capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória aguda à injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida (Biogel P-100) – os camundongos AIRmax e AIRmin (IBAÑEZ et al., 1992; STIFFEL et al., 1990).

Estas linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin foram selecionadas para os fenótipos de máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogênea (F0), resultante de acasalamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/c, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), híbridos F1 e segregantes F2, conforme esquema da F**igura 1**.

Figura 1 - Demonstração esquemática da população F0 das linhagens AIR



Fonte: Baseado em: (IBAÑEZ et al.,1992)

O processo de seleção foi baseado nas características fenotípicas individuais dos animais da população F0. Assim, foram escolhidos os animais que apresentavam alta ou baixa reatividade inflamatória aguda segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea no dorso do gel de poliacrilamida, agente flogístico não imunogênico. Os acasalamentos foram repetidos em gerações consecutivas até ser atingida a máxima separação fenotípica entre as duas linhagens (**Figura 2**), onde se observou a conservação dos fenótipos extremos, indicando que os alelos dos genes relacionados ao controle da AIR fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, entretanto, um fundo genético heterogêneo (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO FILHO, 1994; STIFFEL et al., 1990).

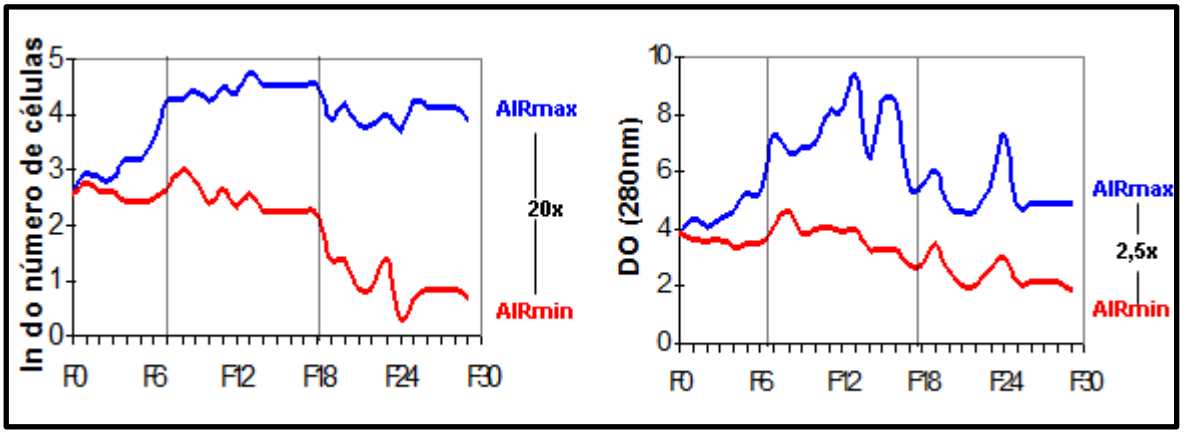
Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens AIR, indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de máxima e mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção.

Por métodos de genética quantitativa foi estimada a participação de 7 a 11 *loci* gênicos independentes na regulação da AIR (BIOZZI et al., 1998).

A diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel é de aproximadamente 20 vezes a favor da linhagem AIRmax, sendo os neutrófilos as células predominantes no exudato. Esta diferença fenotípica entre as linhagens é um fenômeno geral que afeta todos os tecidos vascularizados em resposta a outros flogógenos clássicos do tipo carragenina e zimosan (VASQUEZ-BRAVO, 1996) ou, ainda, por bactérias vivas ou inativadas (ARAÚJO et al., 1998), veneno de *Bothrops jararaca* ou *Lonomia obliqua* (CARNEIRO et al., 2002; ; CARNEIRO et al., 2008; RAMOS et al., 2004).

A resposta imune específica dos camundongos AIRmax e AIRmin parece não ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos contra antígenos naturais complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente, as reações de hipersensibilidade tardia a eritrócitos ou Salmonella Typhimurium foram idênticas nas duas linhagens.

Figura 2 – Divergência entre as linhagens AIRmax e AIRmin. Celularidade e concentração protéica ao longo do processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin até a 30º geração.



Fonte: Modificado de BIOZZI et al., 1998.

Por outro lado, um dos fenótipos que diferenciam os animais AIRmax dos animais AIRmin é a resistência a infecções por patógenos intracelulares, uma vez que camundongos AIRmax são significativamente mais resistentes mostrando uma DL50 na ordem de 1000, 100 e 50 vezes maiores do que os animais AIRmin para

Salmonella Typhimurium, Listeria monocytogenes e Escherichia coli, respectivamente. Esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada à sua habilidade em controlar o crescimento bacteriano no baço, à resposta inflamatória local e à produção de citocinas (ARAÚJO et al., 1998).

Além disso, estes animais também vêm sendo estudados com relação a outros aspectos da imunidade: mecanismos inflamatórios e imunes que interferem no desenvolvimento de doenças autoimunes como artrite experimental produzida por óleo mineral, sendo os AIRmax mais susceptíveis (VIGAR et al., 2000); a resposta inflamatória máxima propicia a diminuição da rejeição de transplante singênico de pele (LAROCCA et al., 2008). Quanto à capacidade em desenvolver tumores quimicamente induzidos, os camundongos AIRmax apresentam maior resistência ao desenvolvimento de tumores cutâneos induzidos pelo DMBA (Dimetilbenzoantraceno) do que os AIRmin, tanto no número de papilomas (multiplicidade) como na porcentagem de animais acometidos (incidência) (BIOZZI et al., 1998; DE SOUZA et al., 2009). O mesmo também foi constatado com relação ao desenvolvimento de metástases após transplante de células de melanoma, onde os camundongos AIRmin foram mais propensos do que os AIRmax (MARIA et al., 2001). A carcinogênese química pulmonar provocada por uretana também discriminou estas duas linhagens: os animais AIRmax mostraram-se altamente resistentes a este tratamento e os animais AIRmin mais susceptíveis (MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005).

Em estudos de associação fenotípica entre patologias e intensidade de reatividade inflamatória foi demonstrado que genes reguladores da inflamação aguda podem estar também envolvidos no controle da resistência ou susceptibilidade a infecções ou a neoplasias (BIOZZI et al., 1998; Di Pace et al., 2006; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005). Em 2003, estudos do grupo demonstraram ainda que o maior número de neutrófilos encontrado no exudato dos camundongos AIRmax em resposta a injeção s.c de Biogel P-100® é decorrente de pelo menos três fatores, à saber: *i*) maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltrantes após tratamento com Biogel, *ii*) maior resistência à apoptose das células do exudato e *iii*) maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros (RIBEIRO et al*.,* 2003). Este último fator embasou o desenvolvimento de outros estudos de investigação da mielopoese na linhagem AIR que permitiram a observação da diferente capacidade proliferativa das células da

medula óssea entre os camundongos AIRmax e AIRmin em condições basais, demonstrando que os camundongos AIRmax possuem maior produção de células precursoras mielóides , macrófagos e neutrófilos frente a estímulos hematopoiéticos *in vitro* (COSTA, 2008).

O estudo da mielopoese nos animais AIRmax e AIRmin propiciou, até o momento, uma visão geral da capacidade hematopoiética destas linhagens, revelando importantes diferenças celulares e moleculares regulatórias da proliferação e diferenciação dos progenitores e células hematopoéticas, bem como a influência destes fatores nos fenótipos de alta ou baixa intensidade da resposta inflamatória aguda.

1.2 Resposta Inflamatória Aguda

A inflamação é um processo básico, dinâmico, cuidadosamente regulado pelo qual os tecidos do corpo respondem a uma injúria. Esta reação não específica da imunidade normalmente leva ao reparo de funções e estruturas visando uma manutenção da homeostase tecidual. Na presença de organismos patogênicos protege contra infecções mediando uma resposta imune. Portanto, acredita-se que a resposta inflamatória controlada possa atuar como um mecanismo benéfico dos tecidos vascularizados a agressões físicas, químicas ou biológicas. Por outro lado, a inflamação prolongada é uma característica de diversas doenças crônicas e de autoimunidades (HART, 2002; HENSON, 2005; MEDZHITOV, 2008; MOULIN et al., 1990).

As características iniciais de um processo inflamatório são alterações no fluxo sanguíneo local associado ao acúmulo e ativação de células inflamatórias de origem hematopoética, seguido pela remoção dos organismos, restos de células e das próprias células inflamatórias para que ocorra o reparo tecidual e a reposição das células e da matriz extracelular (HENSON, 2005).

O processo é orquestrado principalmente por uma variedade de mediadores inflamatórios - histaminas, prostaglandinas (PGE), cininas e leucotrienos (LT) – citocinas e quimiocinas os quais imediatamente desencadeiam a formação de um exudato inflamatório local, composto principalmente de proteínas plasmáticas e de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Fatores solúveis, mediadores inflamatórios químicos e citocinas, promovem mudanças no fluxo sanguíneo e na permeabilidade

vascular produzindo os sinais clássicos da inflamação descritos por *Cornelius Celsus*: *dor, rubor, calor e edema* (Revisado em: SERHAN et al., 2005).

Uma rede complexa de mediadores solúveis liberados após estímulo inflamatório atua no estabelecimento das condições fisiológicas ideais para que ocorra a migração de células para o sítio da injúria. Os leucócitos, normalmente restritos aos vasos sanguíneos, extravasam da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) através das vênulas pós-capilares seguindo três passos coordenados:

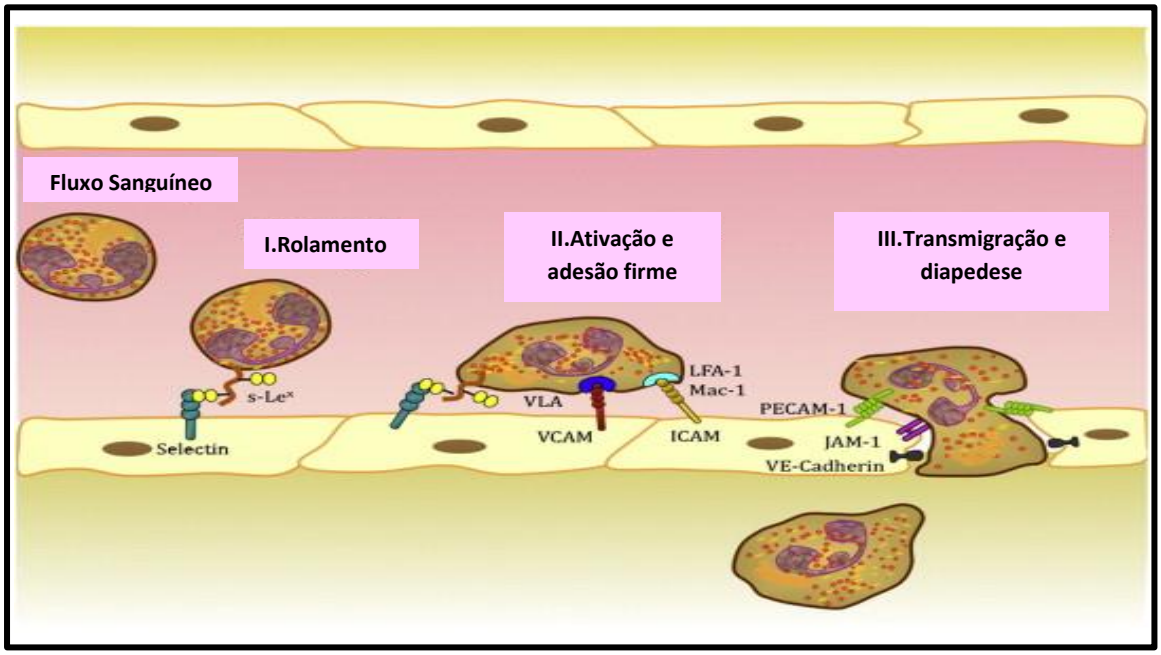
i) Rolamento de leucócitos sobre a parede endotelial: a velocidade do fluxo sanguíneo normal é extremamente rápida na camada microvascular a fim de evitar as interações das células sanguíneas com a parede dos vasos. No entanto, uma ligação temporária dos leucócitos com o endotélio ocorre por meio da interação das L-selectinas, P-selectinas e E-selectinas com glicoproteínas 1 ligantes de P-selectinas (PSGL1), ambos presentes na superfície dos leucócitos e células endoteliais.

ii) Adesão firme às células endoteliais: durante a inflamação as células endoteliais são ativadas pelas citocinas inflamatórias a expressar moléculas de adesão. Assim, os leucócitos tornam-se imobilizados pela adesão firme a superfície das células endoteliais mediada pela ligação das ICAM-1 com as integrinas β_2 (LFA-1, MAC-1 e $\alpha_x\beta_2$), sendo preferencialmente presos nas junções celulares do endotélio.

iii) Transmigração para o acúmulo no sítio de injúria: antes de atravessarem as vênulas pós-capilares, os leucócitos arrastam-se no interior dos vasos sanguíneos por meio da interação MAC-1- ICAM-1 até encontrarem um local para a transmigração. Os leucócitos ativados liberam fatores que aumentam a permeabilidade da barreira endotelial. As células endoteliais redistribuem as moléculas de junção de uma maneira que favorece a transmigração que será mediada pelas PECAM-1, ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-B, JAM-C E ESAM. Podem ocorrer dois tipos de transmigração, a saber: a rota paracelular onde os leucócitos migram através das junções endoteliais e envolve a liberação de VE-caderina expressa nas células endoteliais e a rota transcelular onde a migração ocorre através do corpo das células endoteliais. Neste último caso a molécula ICAM-1 é translocada para regiões ricas em caveolina e actina formando um canal intracelular de organelas vesículo-vacuolares que permitem a passagem das células por entre

uma fina parte do endotélio (LEY et al., 2007; YUAN et al., 2012). Este processo é ilustrado na **Figura 3.**

Figura 3 - Processo esquemático de adesão e migração transendotelial.



Em resposta a um estímulo inflamatório é aumentada a expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais e leucócitos. (I) - O rolamento dos leucócitos ao longo da parede endotelial acontece por meio das fracas interações mediada pelas selectinas.(II) – Em seguida a adesão firme dos leucócitos ao endotélio ocorre por meio da ligação das integrinas, sobre a superfície dos leucócitos, a ICAM-1 ou VCAM-1 na superfície das células endoteliais. (III) – Subsequentemente, os leucócitos transmigram através do endotélio microvascular por uma complexa interação das células endoteliais com as moléculas de junções celulares, incluindo VE-caderina, JAMs e PECAM-1.
Fonte: (YUAN et al., 2012)

Todos os leucócitos podem responder aos sinais de ativação pela alteração da composição, expressão e/ou atividades funcionais das suas moléculas de tráfico. Uma vez no tecido inflamado, os leucócitos tornam-se ativados e realizam a defesa contra as bactérias por meio de receptores de superfície que são capazes de reconhecer e ligar constituintes comuns a muitas superfícies microbianas, os PAMPs (do inglês: [Pathogen-Associated Molecular Patterns]). Os neutrófilos, por sua vez, tentam eliminar os patógenos pela liberação dos conteúdos dos seus grânulos, os quais incluem a proteinase 3, catepsina G e elastases, das espécies reativas do oxigênio (ROS) e espécies reativas do nitrogênio (MIDDLETON et al., 1997; NATHAN, 2006; POBER; SESSA, 2007).

1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são células indispensáveis para a defesa contra os microrganismos, produzidos em grande quantidade exclusivamente na MO. A velocidade de produção destas células depende da vida média da população circulante, que geralmente apresenta uma meia-vida curta com alta taxa de apoptose espontânea. Estes leucócitos polimorfonucleares, representam, em camundongos condições basais, ao redor de 15% do total de leucócitos circulantes, porém, na vigência de um estresse com ativação do sistema imunológico, sua população pode ser sensivelmente aumentada atingindo níveis de até 70% (ABRAMSON; WHEELER, 1993; GORDON; LEWIS; MARLEY, 2002; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Os níveis de neutrófilos circulantes são bastante variáveis em populações humanas e em linhagens isogênicas de camundongos, sugerindo que fatores genéticos influenciam a proliferação e diferenciação dos progenitores mielocíticos na medula óssea bem como os mecanismos de mobilização celular (PETERS et al., 2002; VIETINGHOFF; LEY, 2008).

Os neutrófilos são classicamente caracterizados pela sua habilidade de agir como células fagocíticas, liberar enzimas a partir dos seus grânulos e intermediários reativos do oxigênio com potencial microbicida. A MO contém uma grande reserva de neutrófilos maduros que pode ser imediatamente mobilizada em resposta a uma inflamação, infecção ou estresse. Estes neutrófilos que constituem a reserva da MO residem nos nichos do tecido medular e são separados da circulação pelo endotélio sinusoidal da medula. Portanto, os neutrófilos atravessam o endotélio preferencialmente pelo processo de migração transcelular (BORREGAARD, 2010; BURDON et al., 2008).

As quimiocinas são geradas localmente no sítio inflamatório e orquestram o recrutamento de subpopulações de leucócitos a partir do sangue para o tecido inflamado. Após o recrutamento dos neutrófilos para o local da inflamação, há a necessidade de eliminá-los para evitar o dano tecidual excessivo e para promover a resolução da inflamação. Neste contexto, a homeostase dos neutrófilos representa um balanço entre a produção, mobilização e limpeza dos neutrófilos na circulação (ASHCROFT et al., 1999; ASHCROFT et al., 2000).

A limpeza dos neutrófilos apoptóticos ou senescentes é realizada pelos macrófagos residentes na MO, baço e fígado. Após a ingestão destas células, os

macrófagos secretam TGF-β e IL-10, que são citocinas anti-inflamatórias e também IL-23 que, por sua vez, suprime a expressão de IL-17 nas células TH17. Esta diminuição da citocina IL-17 resulta na diminuição dos níveis sistêmicos de G-CSF que acarretará em menor produção e liberação dos neutrófilos (ASHCROFT et al., 1999; ASHCROFT et al., 2000).

Os neutrófilos produzem uma variedade de fatores de crescimento, tais como IL-8 e VEGF que promovem a revascularização e reparo do tecido lesado. Contrariamente, alguns estudos demonstram um papel negativo dos neutrófilos no reparo tecidual em consequência da liberação inapropriada dos produtos citotóxicos que podem acelerar o dano tecidual. No local de injúria, os neutrófilos secretam proteases que irão converter as citocinas presentes no local a formas ativas ou inativas e assim induzir a um aumento no dano tecidual (ASHCROFT et al., 1999; ASHCROFT et al., 2000).

A produção e regulação dos níveis dos PMNs mostram-se importante tanto no controle de infecções quanto nas doenças inflamatórias, visto que níveis anormalmente baixos de neutrófilos no sangue (neutropenia) promovem o aumento da susceptibilidade a infecções e, por outro lado, o número excessivo dessas células contribui para o dano tecidual em patologias como artrite reumatóide e síndrome do desconforto respiratório do adulto (ASHCROFT et al., 2000; FURZE; RANKIN, 2008; RANKIN, 2010; STARK et al., 2005).

1.3 Hematopoese

A hematopoese é o processo no qual o sistema hematopoético garante a produção balanceada e a contínua renovação de todas as diferentes linhagens celulares que constituem o sangue e o sistema imune (OGAWA, 1993). O processo ocorre em tecidos especializados capazes de proporcionar a manutenção e diferenciação das HSPCs. O sítio predominante de hematopoese é a MO que se mostra como um dos tecidos ativamente mais proliferativos do corpo produzindo, em humanos cerca de 10^{11} a 10^{12} células sanguíneas maduras por dia (GORDON; LEWIS; MARLEY, 2002).

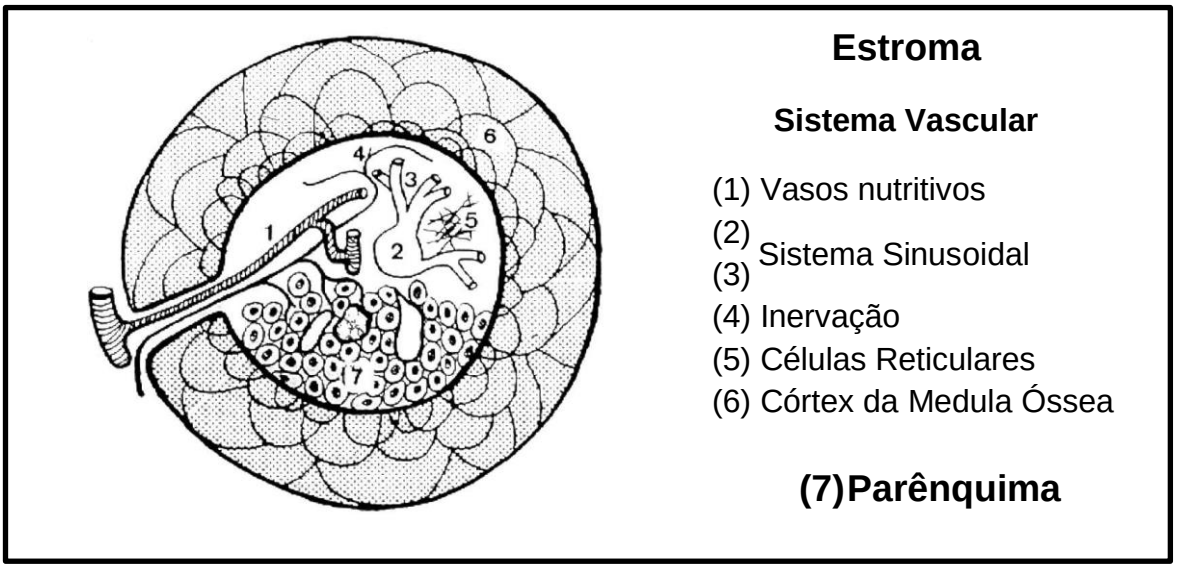
A formação das células sanguíneas tem seu início no saco vitelínico fetal, e mais tarde passa a ocorrer predominantemente no fígado e no baço. Estes últimos podem também suportar a hematopoese extramedular durante a hematopoese

normal ou na vigência de uma resposta imune em infecções e desordens hematopoéticas, como por exemplo a mielofibrose primária, que causa um dano severo à MO (CHRISTOPHER; LINK, 2007; revisado em: KIM, 2010). A MO torna-se funcionalmente ativa como um sítio hematopoético entre o 4° e o 5° mês da gestação humana e após o nascimento nos camundongos. A hematopoese necessita de um nicho especializado para o seu desenvolvimento, sendo este um dos fatores limitantes da hematopoese extramedular na periferia.

O microambiente medular é composto de uma variedade de tipos celulares e seus produtos, sendo ambos responsáveis por regular a hematopoese na homeostase e em condições de estresse (Revisado em: KIM, 2010). Para entrar na circulação as células hematopoéticas devem migrar através da barreira que separa o compartimento hematopoético da circulação, denominado cordão hematopoético. Esta barreira é formada pelo endotélio sinusóide e permite uma seletividade onde somente os neutrófilos maduros são liberados para a circulação em condições homeostáticas (CHRISTOPHER; LINK, 2007). De acordo com a **Figura 4** que esquematiza um corte transversal do fêmur de um camundongo, observa-se que a cavidade do osso é preenchida por um estroma celular constituído de células vasculares com vasos nutritivos e um sistema sinusoidal que permite a entrada de células recém-formadas e liberação para a porção venosa do sangue periférico. Há ainda a presença de uma rede de células reticulares e do sinusóide central (Revisado em: FLIEDNER et al., 2002).

As células da medula óssea são inervadas por fibras mielinizadas e não-mielinizadas. O parênquima medular é composto por todos os progenitores das células hematopoéticas e estas células, preferencialmente, localizam-se próximas ao endósteo do osso. Em camundongos é possível observar uma evidente distribuição das células progenitoras na periferia da MO. Por exemplo, as células-tronco quiescentes residem próximas aos osteoblastos por serem nichos caracterizados pelo baixo fluxo sanguíneo e baixa tensão de oxigênio. Entretanto, as células-tronco mitoticamente ativas residem próximas ao lado abluminal dos sinusóides (BORREGAARD, 2010).

Figura 4 - Arquitetura da Medula Óssea em corte transversal do fêmur de camundongo



Esquema dos elementos essenciais para as funções da Medula Óssea
Fonte: (FLIEDNER et al., 2002)

1.3.1 Células-tronco hematopoéticas

Todas as células hematopoéticas são geradas a partir de uma população rara de células-tronco hematopoéticas pluripotentes, as denominadas HSCs (Do inglês: [Hematopoietic Stem Cell]). Podem ser subclassificadas em células-tronco mais primitivas de longa duração denominadas LT-HSCs (Do inglês: [Long-Term Hematopoietic Stem Cell]), onde uma única LT-HSC é capaz de reconstituir as populações de células sanguíneas por um longo período da vida do organismo e ainda em células-tronco de curta duração as ST-HSCs (Do inglês: [Short-Term Hematopoietic Stem Cell]), que originam os progenitores multipotentes MPPs e possuem uma longevidade limitada a poucos meses (SIGVARDSSON, 2009).

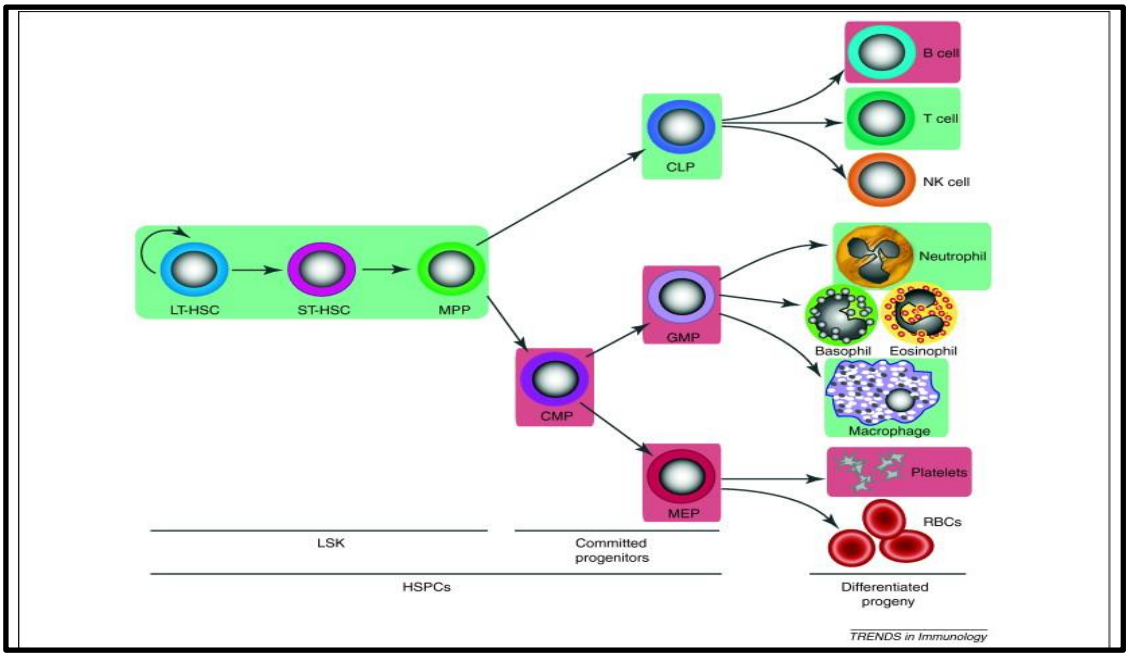
As HSCs são capazes de auto-renovação originando células-filhas idênticas ou mais diferenciadas capazes de formar as células progenitoras comuns: CMPs (Do inglês: [Common Myeloid Progenitor]) e CLPs (Do inglês: [Common Lymphoid Progenitor]). Conforme o tipo de população celular formada o processo recebe o nome de: Granulopoese, Eritropoese, Linfopoese, Monopoese e Megacariopoese. Os CMPs originam os MEPs (Do inglês: [Megakaryocyte-Erytroid Progenitors)

comprometidos com a formação dos eritrócitos e megacariócitos, além de formarem os GMPs (Do inglês: [Granulocyte-Macrophage Progenitors]) capazes de gerar os neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (KONDO, 1997; AKASHI et al., 2000).

Neste processo de formação de células do sangue descreve-se que aproximadamente dois-terços da hematopoese são referentes à produção de células mielóides (BORREGAARD, 2010). A complexidade do sistema sanguíneo é aumentada quando consideramos as subpopulações celulares que ainda podem ser formadas. Todavia, o processo pode ser ainda mais complexo apresentando particularidades como no caso da formação das células dendríticas que podem originar-se tanto da linhagem linfóide quanto da mielóide (Revisado em: BUZA-VIDAS, 2007).

O processo hierárquico de desenvolvimento das células hematopoéticas está ilustrado na **Figura 5.**

Figura 5 - As HSCs originam todas as linhagens de células sanguíneas

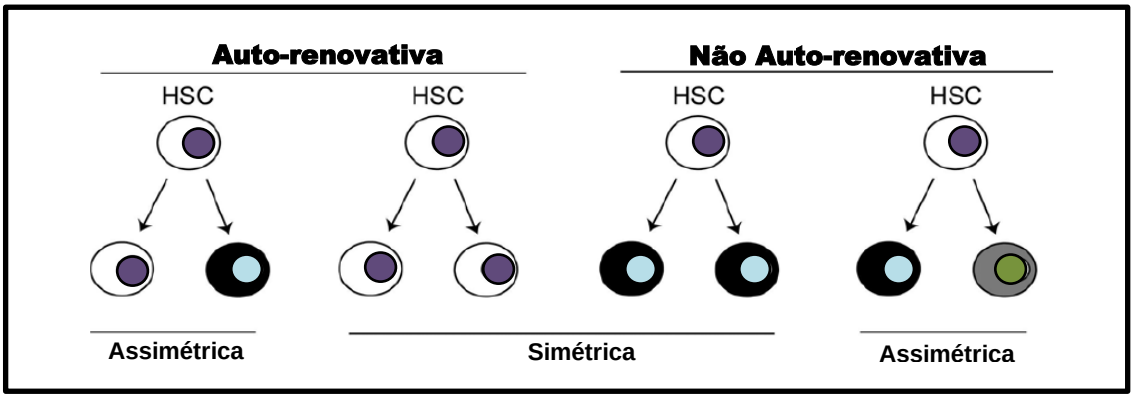


Quando mitoticamente ativas, as HSCs podem autorenovarem-se ou diferenciarem-se em células com um potencial de diferenciação mais restrito. Os progenitores multipotentes (MPP) diferenciam-se para precursores comprometidos com as linhagens linfóide (CLP) ou mielóide (CMP). CLPs originam as células B, T e NK. CMPs originam os progenitores megacariócitos-eritrócitos (MEP) e progenitores granulócitos-macrófagos (GMP) que originam os monócitos, macrófagos e granulócitos.
FONTE: (BALDRIDGE et al., 2011)

Com o objetivo de prover uma constante renovação e fornecimento das células sanguíneas, as HSCs equilibram as taxas de auto-renovação e diferenciação. Este equilíbrio é possível porque estas células podem se dividir simetricamente ou assimetricamente, de modo auto-renovativo ou não auto-renovativo (**Figura 6**). Apenas o modo de divisão simetricamente auto-renovativo permite a manutenção do pool de células-tronco hematopoéticas quiescentes.

Os níveis homeostáticos das HSCs quiescentes e mitoticamente ativas são regulados por sinais intrínsecos e extrínsecos as células - tronco. Acredita-se que as HSCs possam apresentar uma divisão celular rápida ou lenta na homeostase. As células com baixa taxa de divisão celular contribuiriam para a manutenção da reserva de células quiescentes (fases G0/G1 do ciclo celular) que seriam ativadas a progredir no ciclo celular em consequência de um estímulo hematopoético (FOUDI et al., 2009).

Figura 6 - Modelos de divisão das células-tronco hematopoéticas



As HSCs podem dividir-se simétrica ou assimetricamente de uma maneira auto-renovativa ou não auto-renovativa. Nas divisões auto-renovativas ao menos uma das células – filhas mantém-se com uma célula-tronco hematopoética, ao passo que nas divisões não auto-renovativas ambas as células – filhas perdem a capacidade de auto-renovação. As células sem preenchimento com em núcleo roxo representam as células-tronco, pretas com núcleo em azul as células comprometidas e cinzas com núcleo em verde células apoptóticas.
FONTE: Baseado em: (BUZA-VIDAS, 2007)

Adicionalmente, alguns grupos de pesquisa demonstraram que as HSCs expressam TLRs os quais reconhecem moléculas bacterianas e virais. A ligação dos componentes bacterianos ligantes de TLRs pode alterar a hematopoese tanto na medula óssea, induzindo a proliferação e produção de neutrófilos, macrófagos e

células dendríticas, quanto no baço. Os componentes microbianos também podem atuar como importantes reguladores da hematopoese extramedular (Revisado em: KIM, 2010; MASSBERG et al., 2007; NAGAI et al., 2006).

1.3.1.1 Retenção/mobilização das HSPCs na MO

O egresso e mobilização das HSPCs da MO para a circulação ocorre em pequenas quantidades na homeostasia, podendo ser significativamente aumentado, em resposta a diversas situações de estresse, recebendo assim a denominação de recrutamento (LAPIDOT; PETIT, 2002; LAPID et al., 2012). O principal mecanismo de egresso e mobilização das HSPCs é a quebra da interação das moléculas presentes na superfície das HSPCs com as dos seus nichos na MO. Esta quebra de interação acarreta o desprendimento das HSPCs seguido de mobilização a partir da MO. Todavia, muitos fatores e mecanismos, além da proliferação celular, contribuem para a quebra da interação das HSPCs com os seus nichos. Dentre eles podemos citar: *i*) mecanismos intrínsecos de mobilidade; *ii*) atividade de enzimas proteolíticas de serino-metaloproteinases; *iii*) microdomíneos lipídicos; *iv*) moléculas de adesão; *v*) interação das células com oscomponentes da matriz extracelular (LAPID et al.,2012).

Em adição, fatores de crescimento e citocinas, isolados ou combinados, estão envolvidos na indução da mobilização das HSPCs. O G-CSF é descrito como um dos mais efetivos mobilizadores de HSPCs e neutrófilos a partir da MO. Seu mecanismo de ação envolve principalmente a quebra da interação da ligação da quimiciona CXCL12 ou SDF-1 (Do inglês: [stromal-derived growth factor]) com o seu receptor CXCR4 expresso nas células hematopoéticas e estromais resultando, portanto, na inibição da retenção das células na MO. Todavia, este mecanismo de ação ocorre preferencialmente nas células progenitoras da MO, como demonstrado pelo tratamento com compostos antagonistas (DAR et al., 2011; Revisado em: STRYDOM; RANKIN, 2013).

Além da forte capacidade de atração das HSPCs, tanto em camundongos como em humanos, o SDF-1 apresenta também um importante papel na sobrevivência, quiescência e retorno das células progenitoras dos tecidos para a MO. Estudos demonstram que a deleção de SDF-1 ou CXCR4 no sistema hematopoético acarreta uma severa redução da celularidade da MO assim como

prejudica a capacidade de repopulação. As principais observações do papel da interação de SDF-1/CXCR4 no sistema hematopoético foram feitas após a administração de G-CSF (PELED et al., 1999; PETIT et al., 2002; TZENG et al., 2011).

Adicionalmente, outros fatores de crescimento, incluindo SCF, FLT3-L e GM-CSF, também estão envolvidos na indução da mobilização das HSPCs sozinhos ou combinados ao G-CSF. Em contrapartida, também são descritas citocinas que promovem retenção ao invés da mobilização das HSPCs como por exemplo, o fator de crescimento epidermal - EGF (Do inglês: [Epidermal Growth Factor]) e o fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF (Do inglês: [Vascular Endotelial Growth Factor]) (PAPAYANNOPOULOU et al., 1997; PITCHFORD et al., 2009; RYAN et al., 2010; YAN et al., 1994).

Mecanismos adicionais também são descritos como importantes reguladores da retenção, mobilização e egresso das HSPCs no sistema hematopoético. Dentre eles podemos citar:

i) Rho Guanosina Trifosfatase (Rho GTPases) – Uma classe de enzimas de sinalização intracelular com papel crucial na regulação das actinas do citoesqueleto. Diversas citocinas, fatores de crescimento e integrinas sinalizam através das Rho GTPases afetando, desta forma, a migração e adesão das HSPCs, além de regular a expressão de genes que são responsáveis pela proliferação e sobrevivência das células hematopoéticas (CANCELAS; WILLIAMS, 2009; WILLIAMS et al.; 2008).

ii) interação SCF/c-Kit – O receptor tirosina quinase c-Kit é expresso em todas as HSPCs e seu ligante SCF é constitutivamente produzido pelas células endoteliais e estromais da MO. Esta interação regula a retenção das HSPCs e a mobilização por mecanismos semelhantes à interação SDF-1/CXCR4, podendo haver um cruzamento entre estas duas vias de sinalização, onde ocorre a quebra da ligação do SCF ligado à membrana após a ação do G-CSF. O SCF solúvel aumenta a mobilidade e egresso celular (HEISSIG et al., 2002).

iii) interação das moléculas de adesão e seus ligantes – Enzimas secretadas pelos neutrófilos, dentres elas MMP-9, podem favorecer a quebra da interação de VLA-4 ou a integrina α4β1 nas HSPCs com VCAM-1 nas células estromais, fibronectina ou CD44 com a matriz extracelular (ECM, Do inglês: [Extracellular Matrix]) promovem mobilização das HSPC para a circulação ou outros tecidos (LAPID et al., 2012; LEVESQUE et al., 2001).

iv) o sistema imune inato – Monócitos, macrófagos e neutrófilos mostram-se como reguladores centrais da retenção/mobilização das HSPCs na MO. Os monócitos e macrófagos principalmente devido à manutenção dos osteoblastos e produção de SDF-1α e prostaglandinas E2 (PGE2) e os neutrófilos, quando ativados, principalmente pela liberação de enzimas proteolíticas que interferem nas interações de retenção SDF-1α/CXCR4; VLA-4/VCAM-1 e SCF/c-Kit no microambiente medular. Em adição, a ativação da cascata do complemento, pelas vias clássica e alternativa, também medeiam este processo de retenção/mobilização na inflamação e após a administração de G-CSF (LAPID et al., 2012)..

Neste contexto geral dos mecanismos envolvidos na retenção/mobilização e egresso das HSPCs residentes na MO, todas as moléculas e vias participantes são afetadas uma pela outra, resultando em um microambiente complexo que irá regular a função das HSPCs e células maduras da MO (LAPID et al., 2012).

1.3.2 Granulopoese

Os precursores mielóides sofrem mudanças funcionais e morfológicas ao longo do processo de maturação granulocítica, que estão associadas às alterações no tamanho da célula, na forma do núcleo e com o desenvolvimento de organelas estágio - específicas as quais contêm as proteínas necessárias para o papel altamente especializado dos neutrófilos na fagocitose, na função bactericida e na resposta inflamatória. Este complexo processo de diferenciação dos neutrófilos está associado a uma sequência altamente regulada da expressão gênica que resulta na formação de grânulos especializados e de marcadores de superfície (BERLINER, 1998).

A maturação dos neutrófilos inicia-se a partir dos mieloblastos para promielócitos, quando os grânulos primários tornam-se aparentes, segue para mielócito quando cessa a divisão celular e os grânulos secundários começam a aparecer, em seguida metamielócito, bastonete e finalmente neutrófilo diferenciado que apresenta núcleo segmentado e grânulos terciários (FRIEDMAN, 2002). É durante a fase de diferenciação que os neutrófilos adquirem a maior parte de seus grânulos (conhecidos como grânulos primários, secundários e terciários), os quais conferem a atividade microbicida neutrofílica.

Dentre os marcadores iniciais da granulopoese estão o G-CSFR, CD33 e o CD13 e os componentes dos grânulos primários tal como a MPO (mieloperoxidase) elastases, mieloblastina, lisozima. Dentre os terminais podemos citar a lactoferrina, a gelatinase e o marcador de superfície GR1. O complexo CD11b/CD18 pertence a uma família de três glicoproteínas de leucócitos relacionadas que são essenciais para a adesão, migração e ativação durante a inflamação (BORREGAARD; COWLAND, 1997; FARSCHOU; BORREGAARD, 2003; FRIEDMAN, 2002).

Grânulos primários ou azurofílicos peroxidase-positivos aparecem na transição do estágio de mieloblasto para promielócito, e estão presentes tanto em monócitos quanto em neutrófilos. O comprometimento subsequente da linhagem neutrofílica na transição do estágio de promielócito para mielócito está associado com a aquisição de grânulos secundários ou específicos peroxidase-negativos. Dentre os grânulos peroxidase-negativos encontram-se três metaloproteinases: colagenase (MMP-8), gelatinase (MMP-9) e a leukolisina (MMP-25) (BAITON; ULLYOt, 1971; KJEDSEN et al., 1992; STROBL et al., 1993). As metaloproteinases são estocadas na forma inativa e sofrem ativação proteolítica seguida de exocitose. Juntas, as metaloproteinases são capazes de degradar os principais componentes estruturais da matriz extracelular incluindo colágeno, fibronectinas, proteoglicanos, laminina e gelatina. Exercem papel central na degradação das membranas basais vasculares e estruturas intersticiais durante o extravasamento e migração dos neutrófilos (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Como a maioria das células hematopoéticas maduras apresentam uma meia-vida curta, o processo de hematopoese em condições basais atua para manter a produção contínua de novas células. O processo de granulopoese em condições homeostáticas é altamente regulado, envolvendo a ação de citocinas e fatores de transcrição que agem em estágios específicos do desenvolvimento celular e atuam como importantes moduladores do processo de formação de células sanguíneas (CEREDIG et al., 2009; KONDO et al., 2003). Entretanto, situações fisiológicas de estresse causadas por fatores, tais como: sangramento, hipóxia, inflamação aguda ou infecção, liberam local e sistemicamente diversas citocinas e fatores solúveis capazes de suprimir a hematopoese ou ainda estimular a medula óssea a responder rapidamente a estes estímulos, aumentando e acelerando a produção de leucócitos (JOHNNIDIS et al., 2008; MEANSAND Jr, 1995; PANOPOULOS et al., 2006; ZHANG et al., 2005).

Na resposta inflamatória aguda e patologias onde a inflamação é relevante, a demanda por neutrófilos induz e acelera a granulopoese acarretando a mobilização dos neutrófilos para a circulação e, em consequência, uma breve diminuição de neutrófilos na MO e subsequente neutrofilia reativa no sangue periférico. Esta resposta alterada da medula óssea em consequência da inflamação ocorre por um processo distinto de formação de neutrófilos denominado de granulopoese emergencial (BASU et al., 2000; SIGH et al., 2008; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005; YAÑEZ et al., 2009; ZHANG et al., 2008).

1.3.2.1 Granulopoese emergencial

O estresse localizado e aquele que afeta o organismo por inteiro desencadeiam mudanças importantes na granulopoese basal. A regulação da maquinaria hematopoética durante uma condição de estresse é crítica para o estabelecimento de uma defesa efetora contra os patógenos e para a manutenção da homeostase (Revisado em: LAPID et al., 2012). A granulopoese em condições de homeostase é conduzida por uma via de desenvolvimento distinta da granulopoese conduzida pela demanda emergencial. O conceito clássico de indução da mielopoese emergencial envolve a ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), quando esta resposta é induzida por patógenos, sobre as células hematopoéticas ou não - hematopoéticas residentes na MO, que por sua vez, desencadeiam uma cascata de sinalização, levando à liberação de quimicionas e citocinas (SHI; PAMER, 2011; Revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012).

Paralelamente, as citocinas exercem suas funções pleiotrópicas agindo nas células imunes no local da infecção e estimulando a produção de células mielóides a partir dos precursores na MO (METCALF, 2008; SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Em nível molecular, dois fatores de transcrição distintos, C/EBPα e C/EBPβ, desempenham um papel crítico no tempo da granulopoese: o C/EBPα como um fator indispensável para manter o processo de granulopoese em condições basais e o C/EBPβ como um fator de transcrição que facilita a proliferação dos progenitores mielóides em resposta aos sinais inflamatórios (HIRAI et al., 2006). Além disso, descreveu-se um mecanismo de sinalização diferencial na granulopoese basal e emergencial, demonstrando que a sinalização mediada por IFN-γ é essencial para a

diferenciação e mobilização das HSPCs e células mielóides na granulopoese induzida pela infecção com *E. muris*, porém esta sinalização não é requerida em situações homeostáticas (MACNAMARA et al., 2011; METCALF et al., 1996).

Um mecanismo complementar de competição por espaço assegura a produção hematopoética aumentada. Na homeostase, a mielopoese e a linfopoese desenvolvem-se no mesmo nicho medular mantendo uma proporção estável de células mielóides e linfóides. Todavia, estímulos inflamatórios causam reduzida expressão de fatores de retenção e crescimento de células linfoides, levando à mobilização e recrutamento desta população a partir da MO para os órgãos linfoides secundários. O espaço gerado pela mobilização dos linfócitos facilita a expansão da mielopoese (CAIN et al., 2011; UEDA et al., 2004; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

1.3.2.2 Papel do ácido retinóico na diferenciação granulocítica

O ácido retinóico all-trans (ATRA), um metabólito da vitamina A, é constantemente produzido em níveis elevados pelo intestino e exerce um papel fundamental em diversas atividades biológicas que incluem morfogênese do osso, desenvolvimento embrionário, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. No sistema imune e hematopoético este metabólito atua principalmente sobre as células mielóides e linfócitos na regulação funcional, expressão gênica e diferenciação das mesmas (KIM, 2011). O ATRA modula a expressão gênica das células mielóides por meio de duas famílias de fatores de transcrição ativados pelo ligante incluídas em uma distinta classe de receptores nucleares: - os receptores de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóicos (RXRs). Estes receptores nucleares são ativados pelo ácido retinóico all-trans e controlam a expressão dos genes alvos pela ligação às sequências específicas na molécula de DNA denominadas elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs) situados nas regiões promotoras de genes de resposta imediata ou genes de resposta cooperativa.

Três formas de receptores de ácidos retinóicos (RARs) e receptores X retinóicos (RXRs) têm sido identificados: α, β e γ. RARα e RARγ são descritos por serem as formas mais importantes na regulação da granulopoese. Estudos realizados em células da medula óssea derivada de camundongos deficientes do RARα e do RARγ revelaram o papel essencial da sinalização mediada pelo RAR na diferenciação terminal dos granulócitos, visto que a deficiência de apenas um dos

receptores afeta o desenvolvimento das células mielóides, entretanto, a deficiência simultânea de ambos os fatores RARα e RARγ acarreta o bloqueio da diferenciação granulocítica (CHAMBON, 1996; LABRECQUE et al., 1998; WARREL et al., 1991).

1.3.3 Fator estimulador de colônias (CSFs) e seus receptores

As citocinas são glicoproteínas que podem ser secretadas ou ligadas à membrana. A interação citocina – receptor, mesmo em concentrações muito baixas de uma citocina, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que, por sua vez, pode levar a diversas respostas biológicas capazes de regular muitas funções celulares sobre vários tecidos (METCALF, 2008). De uma forma geral, os CSFs medeiam a sobrevivência, proliferação, diferenciação e modulação funcional (quimiotaxia, degranulação, ativação, adesão, citotoxicidade), além da inibição da apoptose de várias populações de células maduras do sangue e seus precursores. Todavia, baseado na relação entre a resposta inflamatória mediada pelos CSFs e algumas patologias, tais como: artrite reumatoide, obesidade e câncer, alguns estudos propõem um papel mais amplo para estes fatores de crescimento na resposta imune (METCALF, 2008; REDDY et al., 2000).

As mesmas citocinas controlam a produção de células hematopoéticas em condições homeostáticas ou em condições de estresse. Entretanto, os padrões de expressão dos seus receptores podem diferir em ambas as condições. Neste contexto, estudos sugerem um papel ativo dos receptores na modulação da hematopoese durante a inflamação ou infecção sistêmica. Os receptores de CSFs são pouco expressos nas HSCs, sendo expressos em níveis mensuráveis principalmente nas HSPCs (Revisado em: LOPEZ et al., 2010; Revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012).

Um grande número de citocinas, entre 60 a 70, que atuam regulando a hematopoese já foram descritas. No presente trabalho serão mencionadas as principais características biológicas, funcionais e moleculares das três principais citocinas envolvidas na regulação da mielopoese, a saber: G-CSF; GM-CSF e IL-3. A **Tabela 1** apresenta um resumo das principais atividades e células produtoras de outros fatores estimuladores de crescimento, quimicionas e citocinas da resposta inflamatória.

1.3.3.1 Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF)

A citocina G-CSF é crucial para a granulopoese, uma vez que direciona o comprometimento dos progenitores multipotentes (MPPs) estimulando a proliferação dos precursores de granulócitos. Este fator de crescimento hematopoético exerce mais efetivamente suas funções sobre as células mielóides, sendo, portanto responsável pela sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração de granulócitos (LINK, 2012). O papel fisiológico do G-CSF na granulopoese basal e emergencial em resposta à inflamação, infecções ou admistração de G-CSF, tanto em camundongos quanto em humanos, vem sendo confirmado por muitos trabalhos demonstrando que esta citocina é capaz de induzir uma significante expansão dos neutrófilos na MO e mobilização dos mesmos para a circulação. Além disso, demonstrou-se que deleções homozigóticas do G-CSF e/ou G-CSFR ou ainda a expressão constitutiva de uma mutação no gene *Gcsfr* acarreta neutropenia severa. Todavia, ainda se observa a presença de neutrófilos na circulação e na MO, indicando que a granulopoese também pode ocorrer na ausência da sinalização pela interação G-CSF/G-CSFR (DAY; LINK, 2012; TOUW; VAN DE GEIJN, 2007; WARD, 2007).

Todas estas funções são mediadas pela sinalização dependente do receptor de G-CSF (G-CSFR) expresso em uma variedade de células hematopoéticas incluindo os precursores mielóides, granulócitos maduros, células-tronco hematopoéticas, monócitos e linfócitos. No desenvolvimento granulocítico observa-se variações nos níveis de expressão deste receptor de acordo com o estágio de maturação granulocítica. Além disso, células não-hematopoéticas também podem expressar o G-CSFR em diferentes níveis, como os cardiomiócitos e tecido placentário (Revisado em: LIONGUE et al., 2009). O G-CSFR é uma proteína transmembrana de cadeia única que apresenta uma larga região extracelular contendo domínios semelhantes a imunoglobulinas (CRHs) e três domínios tipo III de fibronectinas, características da superfamília de receptores de classe I (TOUW; VAN DE GEIJN, 2007). A ligação da citocina G-CSF ao seu receptor leva à multimerização e ativação de uma cascata de sinalização que ativa as vias JAK/STAT/SOCS, Ras/Raf/Erk e PI-3 quinase/AKT. Na via JAK/STAT o G-CSF ativa Jak1, Jak2, and Tyk2 seguidos pela ativação de Stat1, Stat3, and Stat5, sendo a Stat3 a principal proteína ativada pelo G-CSF. A sinalização mediada pelo G-CSFR

é finalizada por alguns reguladores negativos os quais incluem Shp-1 e Socs-3, em seguida ocorre a internalização do receptor e ubiquitinazação (BASU et al., 2002; TOUW;VAN DE GEIJN, 2007).

1.3.3.2 Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)

O GM-CSF é uma citocina pleiotrópica produzida por várias células, incluindo macrófagos, mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais em resposta à ativação imune e a ação de citocinas que medeiam à resposta inflamatória (IL-1b eIL-6) . A produção de GM-CSF normalmente requer um estímulo e esta pode ser facilmente mensurada *in vivo* (METCALF, 2008). Esta glicoproteína exerce seus efeitos sobre uma variedade de tipos celulares do compartimento hematopoético atuando principalmente na proliferação e diferenciação dos progenitores multipotentes GMPs, capazes de formar neutrófilos ou macrófagos. Entretanto, estimulam também a diferenciação de outros tipos celulares da série mielóide incluindo os megacariócitos, eosinófilos, eritrócitos e células dendríticas (Revisado em: QUESENBERRY; COLVIN, 2011).

Como resultado de um estímulo proliferativo direto sobre todos os progenitores e precursores da linhagem mielocítica, a administração de GM-CSF pode induzir monocitose, eosinofilia e ainda uma rápida neutrofilia. Adicionalmente, o GM-CSF também é um potente estimulador do crescimento de unidades formadoras de colônias de eritrócitos e megacariócitos. Em contrapartida, a sua ação não se estende ao desenvolvimento de células eritróides e megacariócitos terminalmente diferenciadas, sendo necessária a combinação com fatores de crescimento específicos de linhagem, tais como a eritropoietina (EPO) e/ou IL-6 (Revisado em: LOPEZ et al., 2010; Revisado em: QUESENBERRY; COLVIN, 2011).

O GM-CSF age pela ligação ao seu receptore heterodimérico compostos por uma subunidade α específica do receptor de GM-CSF e por uma subunidade β comum e compartilhada com os receptores de IL-3 e IL-5. A dimerização, induzida pela citocina, das duas subunidades α e β são essenciais para iniciar a resposta celular. Considerando a biologia estrutural e conservada, estes receptores são classificados como membros da família de receptores de citocinas tipo I. A citocina GM-CSF ativa a célula por pelo menos três vias de sinalização:

i) a via JAK/STAT; *ii*) a via ras/MAP quinase e *iii*) via PI-3 quinase.

As vias de sinalização JAK, STAT3, STAT5, PI3-quinase bem como MAPK p38, vem sendo implicadas na regulação da apoptose dos neutrófilos e eosinófilos por GM-CSF, IL-5 e IL-3 (DE VOS et al., 1992; EPLING-BURNETTE et al., 2001).

A ação redundante dos fatores de crescimento hematopoéticos pode justificar o fato da expressão do receptor heterodimérico de GM-CSF não se mostrar essencial para a hematopoese em condições basais. A sinalização do receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 tem sido descrita como importante em situações emergenciais aumentando e acelerando a produção de leucócitos para gerar uma resposta imune efetiva. Além disso, o receptor de IL-3 e GM-CSF também estão associados a leucemias humanas. A leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e crônica (LMMC) desenvolvem-se principalmente como consequência da secreção autócrina e anormal de GM-CSF (HERCUS et al., 2009).

.1.3.3.3 Fator estimulador de colônias de multi - linhagens (IL-3)

A interleucina 3 (IL-3) estimula a sobrevivência e a proliferação das células-tronco e progenitoras hematopoéticas promovendo o desenvolvimento de muitos tipos celulares na MO atuando como o principal estímulo para a produção e ativação de basófilos e mastócitos. Por apresentarem elevados níveis de expressão de seu receptor (IL-3R), os basófilos podem ser recrutados para os linfonodos em resposta a IL-3 atuando assim na resposta imune efetora a infecções por helmintos (KIM et al., 2010; Revisado em: LOPEZ et al., 1990). O tratamento com IL-3 induz uma eosinofilia rápida e acentuada, porém a admistração crônica aumenta a proliferação de todas as células progenitoras mielóides e sinergiza com G-CSF e GM-CSF na estimulação de unidade formadoras de colônias granulócitos – macrófagos (Revisado em: LOPEZ et al., 2010).

Assim como os outros fatores estimuladores de crescimento hematopoéticos, a ação da IL-3 também é mediada pela sinalização do receptor de IL-3 o qual possui uma subunidade α específica e outra β comum compartilhada entre os receptores de GM-CSF e IL-5. Em camundongos há ainda outra cadeia β específica do IL-3R denominada β_{IL-3}. Tanto os domínios α quanto β são necessários para a sinalização (SAKAMAKI et al., 1992; WEISS et al., 1993).

Da mesma forma que a citocina GM-CSF, o receptor de IL-3 também ativa pelo menos três vias de sinalização i) a via JAK/STAT, ii) a via ras/MAP quinase e iii) via PI-3 quinase.

A molécula IL-3Rα é uma glicoproteína de 60-70 kDa com um único domínio transmembrana que liga a IL-3 com baixa afinidade. No entanto, a dimerização com a cadeia β forma um complexo IL-3R de alta afinidade. Algumas linhagens isogênicas de camundongos (A/J, AKR, A.TH e A.TL) são descritas por apresentarem baixa responsividade das células da MO à estimulação pela IL-3 como resultado da expressão prejudicada da IL-3Rα causada pelo splicing aberrante do RNAm pela deleção do íntron 7 do gene IL-3Rα (ICHIHARA et al., 1995; MIYAJIMA et al., 1993).

1.3.4 Fatores de transcrição na hematopoese

As sequências de DNA codificantes ou as não – codificantes de proteínas apresentam regiões promotoras e acentuadoras que serão ligadas por ativadores ou repressores da transcrição denominados de fatores de transcrição (FT). A regulação transcricional influencia diretamente muitos fenômenos biológicos. Especificamente na hematopoese, a ativação e/ou repressão seletiva dos genes pela ação dos FT está diretamente envolvida na determinação do destino celular e comprometimento específico com uma linhagem (Revisado em: FIEDLER; BRUNNER, 2012; STRUHL, 1995)

Os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação hematopoética podem ser basicamente divididos em 2 categorias: fatores geralmente necessários para definir a hematopoese e aqueles envolvidos mais especificamente na diferenciação de uma única ou de poucas linhagens celulares.

Um exemplo da importância do direcionamento celular orquestrado pelos fatores de transcrição é a escolha da restrição para a linhagem eritróide versus linfóide na transição de MPP para CLP ou MEP. Este direcionamento é modulado pela expressão de *Gata1* e *Pu.1*. *Gata1* é um gene indispensável para o comprometimento com a linhagem eritróide visto que a deficiência deste resulta em um bloqueio da diferenciação eritróide causando anemia severa incompatível com a sobrevivência do organismo. O *Pu.1*, um FT crítico para a hematopoese basal, é essencial para a formação de CMPs, GMPs e CLPs. Camundongos deficientes de

Pu.1 mostram comprometimento na formação de macrófagos maduros, neutrófilos, células dendríticas, osteoclastos, linfócitos B e T (ANDERSON et al., 1998; Revisado em: FIEDLER; BRUNNER, 2012).

Na regulação da linhagem monocítica versus granulocítica, dentre os muitos genes envolvidos neste processo, os membros da família C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Protein) são descritos como cruciais no comprometimento e diferenciação dos progenitores mielóides, podendo ainda regular a capacidade de formação de neutrófilos na hematopoese basal e emergencial. Neste contexto, a expressão de *Cebpa* mostra-se fundamental para a transição de CMP para GMP. Mais adiante no comprometimento celular, a decisão entre o destino para granulócitos versus monócitos dependerá dos níveis de expressão de *Cebpa* e *Pu.1* conjuntamente (ANDERSON et al., 1998; ANDERSON et al., 1999; FRIEDMAN, 2002; HIRAI et al., 2006).

O gene *Cebpa* é expresso em muitos tecidos, incluindo o fígado, sangue e tecido adiposo. É descrito como um gene responsável pela regulação de outros genes críticos para a diferenciação mielocítica, dentre eles o gene repressor da proliferação de monócitos - *Gfi1* (Do inglês: [Growth Factor Independent – 1]). Além disso, favorece a diferenciação granulocítica em consequência da ligação aos promotores de vários genes capazes de ativar e aumentar a expressão de um grande número de genes específicos mielóides, incluindo os receptores de M-CSF, G-CSF, GM-CSF e MPO (BORREGAARD, 2010; LeCABEC et al., 1996; LeCABEC et al., 1997; WANG et al., 2001).

Embora não seja crucial para a diferenciação dos macrófagos, os níveis de expressão do gene *Cebpb* são significativamente aumentados neste processo. Ademais, este gene é essencialmente requerido para a produção de neutrófilos em resposta à inflamação e/ou infecção visto que modula a expressão de um importante acelerador do ciclo celular, o gene *Myc*, permitindo a proliferação efetiva dos progenitores granulocíticos na granulopoese emergencial (HIRAI et al., 2006; SCOTT et al., 1992)

A formação dos granulócitos também é regulada por outro membro da família C/EBP, o C/EBPε, que também interage com reguladores do ciclo celular induzindo a diferenciação terminal dos neutrófilos. Diferentemente dos outros membros da família, a expressão de C/EBPε é restrita às células da linhagem mielóide e não é detectada em tecidos e células não-hematopoéticas (GERY et al., 2004)

O gene *myb* é necessário para a proliferação e sobrevivência de progenitores mielóides normais e células blásticas leucêmicas. A importância deste gene é demonstrada em estudos que evidenciam que a perda da sua expressão prejudica a hematopoese normal, reduzindo a formação de colônias mielóides e eritróides (GEWIRTZ;CALABRETTA, 1988; MUCENSKI et al., 1991). O *myb* modula também os níveis de expressão de outros genes expressos no início da diferenciação mielocítica. O gene *Bcl2*, com função reguladora da apoptose, é um dos alvos do gene *myb* nas células hematopoéticas (FRAMPTON, 1996; MELOTTI et al., 1994; RATAJCZAK et al., 1998).

1.3.5 Modelos instrutivos e permissivos de hematopoese

Estudos em camundongos e humanos indicam que uma célula hematopoética progenitora não comprometida com uma linhagem celular específica pode gerar duas células-filhas que darão origem a duas linhagens diferentes, por exemplo, uma originando macrófagos e monócitos e outra neutrófilos, sugerindo desta forma, que a decisão do destino para uma linhagem é orquestrada à medida que o ciclo celular progride (QUESENBERRY; COLVIN, 2011).

O comprometimento de uma linhagem é um processo pelo qual progenitores multipotentes tornam-se restritos à diferenciação em um único tipo celular. Na literatura, considera - se principalmente duas hipóteses de regulação da hematopoese por fatores extracelulares, como as citocinas, e intracelulares, como a expressão dos fatores de transcrição (Revisado em: BUZA-VIDAS, 2007).

Uma hipótese considera o modelo instrutivo para a formação de células, o qual sugere uma citocina específica para um determinado tipo celular, como por exemplo, o G-CSF, instruindo uma célula progenitora não comprometida a diferenciar-se para um tipo celular específico. Esta diferenciação seria, portanto, determinada pela sinalização mediada pelo receptor desta citocina. Em contrapartida, a hipótese permissiva, sugere que as citocinas agem principalmente por meio de ações permissivas promovendo a sobrevivência seletiva de células progenitoras e multipotentes que expressam o receptor de citocina e os fatores de transcrição que favoreçam a diferenciação para uma linhagem celular específica (Revisado em: BUZA-VIDAS, 2007; RIEGER et al., 2009).

As linhagens AIRmax e AIRmin foram criadas com o objetivo de prover um modelo geneticamente heterogêneo não - isogênico relevante para o estudo de fatores genéticos que controlam a inflamação aguda e o impacto desta regulação em fenômenos fisiopatológicos. Desde a sua criação estas linhagens vem contribuindo largamente para elucidação de mecanismos genéticos e/ou fisiológicos onde o papel inflamatório mostra-se relevante: tumorigênese, artrite, infecções e regeneração tecidual, por exemplo. Além disso, os mecanismos pelos quais estas linhagens desenvolvem intensidades inflamatórias divergentes também vêm sendo extensivamente estudados. Neste sentido, o desenvolvimento deste projeto de pesquisa visou esclarecer os mecanismos operantes na diferente capacidade de produção de células mielóides pelos animais AIRmax e AIRmin e associá-los à intensidade da resposta inflamatória aguda. Acreditamos que os mecanismos envolvidos no diferente potencial de formação de células mielóides nos animais AIRmax e AIRmin seja determinante para os fenótipos de resistência e susceptibilidade a diferentes patologias. Além disso, este estudo poderá contribuir para a identificação de genes ou proteínas que regulam diferentemente a viabilidade, proliferação e diferenciação celular ao longo do processo de formação de neutrófilos e buscar um maior entendimento da influência da constituição genética de populações heterogêneas na regulação de fenômenos patológicos complexos.

Tabela 1 - Citocinas e fatores estimuladores de crescimento celular (continua)

	Nome	Sigla	Célula-Fonte	Principais funções
Fatores de crescimento hematopoético	Fator estimulador de colônias de macrófagos	**M-CSF**	Células endoteliais, macrófagos e fibroblastos	Estimula a formação e sobrevivência de monócitos e macrófagos.
	Fator da célula-tronco	**SCF**	Hepatócitos e células endoteliais.	Estimula a proliferação de células hematopoiéticas prematuras e de mastócitos.
	Eritropoietina	**EPO**	Células peritubulares intersticiais renais e macrófagos da MO.	Estimula a formação de eritrócitos e a liberação destes a partir da medula.
	Trombopoietina; fator de crescimento e desenvolvimento de megacariócitos	**TPO**	Hepatócitos, células renais e endoteliais, fibroblastos	Estimula a proliferação de megacariócitos e a formação de plaquetas.
	Fator de crescimento da célula T	**IL-2**	Células T (CD4+, CD8+), linfócitos grandes granulares (células natural killer ou NK)	Proliferação de células T, B e NK; Efeitos antitumoral e antimicrobiano.
	Fator de crescimento da célula B, T, mastócitos e Células dendríticas.	**IL-4**	Células T	Proliferação de células B, T, mastócitos e células dendríticas; aumenta as atividades citotóxicas. Aumenta a síntese de imunoglobulinas. Estimula proliferação e diferenciação de células dendríticas
	Fator estimulador de colônias de eosinófilos	**IL-5**	Células T	Estimula a formação de eosinófilos; estimula as funções das células T e B.

Tabela 1 - Citocinas e fatores estimuladores de crescimento celular (continuação)

	Nome	Sigla	Célula-Fonte	Principais funções
Fatores de crescimento hematopoético	Fator estimulador da célula B II; fator estimulador do hepatócito	**IL-6**	Monócitos, células tumorais, células T e B, fibroblastos e células endoteliais	Estimula e inibe o crescimento celular; promove diferenciação das células B; Estimula a produção de plaquetas; Age sinergicamente com outros CSFs para estimular proliferação de células mielóides.
	Linfopoietina - 1;	**IL-7**	Tecidos linfóides e linhagens celulares	Fator de crescimento para células T e B
	Fator de crescimento de células T	**IL-9**	Células T	Estimula proliferação de células T e mastócitos;
	Fator estimulador da célula natural Killer	**IL-12**	Macrófagos e células B.	Estimula a expansão de células T e interferon-gama; atuando em sinergia, promove proliferação de células progenitoras hematopoiéticas.
	Fator inibidor da leucemia	**LIF**	Monócitos, linfócitos e células estromais	Estimula a diferenciação das células hematopoiéticas; Induz diferenciação das células renais, desenvolvimento neuronal e remodelação do osso.
Quimiocinas	Quimiciona CXC induzível por LPS (LIX)	**CXCL5**	Células estromais e células hematopoéticas	Estimula a migração e ativação de neutrófilos principalmente na resposta inflamatória;

Tabela 1 - Citocinas e fatores estimuladores de crescimento celular (continuação)

	Nome	Sigla	Célula-Fonte	Principais funções
	Eotaxina	**CCL11**	Células musculares	Induz quimiotaxia de eosinófilos na homeostasia e na eosinofilia associada a alergias.
	Proteínas induzível por IFN-Y (IP-10)	**CXCL10**	Monócitos, células endoteliais e fibroblastos em resposta ao IFN-Y	Induz quimiotaxia de monócitos/macrófagos, células T, NK e células dendríticas; Promove adesão das células T as células endoteliais; Promove inibição da angiogênese.
	GRO1 ou proteína ativadora de neutrófilos	**KC**	Melanócitos	Induz quimiotaxia de neutrófilos.
Quimiocinas	Proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1)	**CCL2**	Monócitos, macrófagos e células dendriticas	Induz quimiotaxia de monócitos, células T e células dendríticas.
	MIG (Do inglês: [Monokine induced by gamma])	**CXCL9**	Monócitos	Induz quimiotaxia de células T.
	Proteína inflamatória de macrófagos 1 (MIP-1α/β)	**CCL3/CCL4**	Macrófagos ativados	Recrutamento e ativação de macrófagos, células T de memória e células T virgens.
	Proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2)	**CXCL2**	Monócitos e Macrófagos ativados	Induz quimiotaxia de leucócitos polimorfonuclares e células – tronco hematopoéticas.

Tabela 1 - Citocinas e fatores estimuladores de crescimento celular (continuação)

	Nome	Sigla	Célula-Fonte	Principais funções
Outras citocinas	Interleucina - 13	**IL-13**	Células T	Age sinergicamente com a IL-4 sobre a maturação das células B; Induz a produção de IFN-Y pelos linfócitos.
	Interleucina - 15	**IL-15**	Macrófagos e monócitos	Compartilha o receptor com a IL-2; Estimula proliferação de linfócitos T CD4 e CD8 ativados, células NK e mastócitos; Atividade quimiotática de células T.
	CTLA-8 ou antígeno 8 associado ao linfócito T	**IL-17**	Células T	Estimula a secretar IL-6, IL-8, G-CSF, LIF, TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-12; Inibe a produção de Rantes induzida por TNF-α e IFN-Y.
	Fator de necrose tumoral	**TNF-α**	Macrofágos ativados, células NK e linfócitos T $CD4^+$	Induz a síntese de proteínas de fase e febre; Induz apoptose; Regulação das células do sistema imune.
	Fator de crescimento endothelial vascular	**VEGF**	Células T, células endoteliais, células do músculo liso e células tumorais	Estimula vasculogênese e angiogênese; Atua como uma citocina pró-inflamatória por induzir a expressão de moléculas de adesão.

Tabela 1 - Citocinas e fatores estimuladores de crescimento celular (conclusão)

	Nome	Sigla	Célula-Fonte	Principais funções
Outras citocinas	Proteína inflamatória de hemopoietina pirógena endógena-1 ou fator ativador de linfócitos macrófagos 2 (MIP-2)	**IL-1α/IL-1 β**	Monócitos, queratinócitos, fibroblastos, linfócitos T e B e células endoteliais em resposta a inflamação	Regulação do sistema Imune; Proliferação de células T e B, bem como de outras células; Induz febre e catabolismo; Produção de proteínas de fase aguda; Ação sinérgica com CSFs para aumentar o potencial proliferativo das células formadoras de colônias.
	Interleucina - 10	**IL-10**	Linfócitos T $CD4^+$, células B, keratinócitos.	Suprime atividade de macrófagos e células dendríticas

Fonte: (ANGIOLILLO et al., 1995; FARBER, 1997; MOSER et al., 1990; PELUS; FUKUDA, 2006; Revisado em: QUESENBERRY; COLVIN, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é o de investigar comparativamente nos animais AIRmax e AIRmin os mecanismos celulares e moleculares operantes na regulação da mielopoese basal e emergencial.

2.2 Estratégias experimentais

i) Análise da celularidade no sítio inflamatório e na circulação;

ii) Quantificação da produção de citocinas, fatores estimuladores de crescimento e quimicionas no exudato e no soro;

iii) A quantificação das células mielóides em diferentes estágios de maturação, precisamente as células tronco hematopoéticas (HSC), progenitores mielóides e células terminalmente diferenciadas por citometria de fluxo;

iv) Expressão do RNAm e proteica dos receptores de fatores de crescimento, GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-3 nas células da MO por meio de PCR em tempo real e citometria de fluxo, respectivamente;

v) Expressão do RNAm dos fatores de transcrição por meio de PCR em tempo real;

vi) Capacidade proliferativa das células progenitoras da MO por meio de cultura clonal e das células totais por meio de cultura líquida em resposta a combinações de fatores de crescimento mielóide associados ou não ao ácido retinóico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados animais AIRmax e AIRmin machos e fêmeas, produzidos e mantidos no biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sob as condições padrões de criação. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA#95/2009) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e da comissão de ética no uso de animais no Instituto Butantan (CEUAIB#630/2009).

3.2 Preparo de Biogel P100

Para a indução da resposta inflamatória aguda foi utilizado uma substância de poliacrilamida, não-imunogênica e não-biodegradável de Biogel P-100 (Bio-Rad®, Hercules, CA). Foram pesados em um kitassato 1,5 gramas de Biogel P-100® e em seguida adicionados 150 mL de PBS previamente aquecido a 90 ºC para hidratar o Biogel por um período de 1 hora à temperatura ambiente. O gás foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e a suspensão foi autoclavada por 20 min a 120 ºC. Após esterilização, centrifugamos a suspensão a 1200 rpm para sedimentação da poliacrilamida e lavamos 3 vezes com salina estéril. O Biogel foi ressuspendido na proporção de $1:1^{1/2}$ em salina estéril.

3.3 Indução e avaliação da resposta inflamatória aguda

Para indução da AIR foram injetados 0,75 mL de microesferas de poliacrilamida Biogel P-100® no tecido subcutâneo do dorso dos camundongos previamente depilados. Após tempos variados de reação (1,5 , 3, 6, 12 e 24 h) o exudato foi obtido por meio da lavagem do local utilizando 1 mL de PBS + Heparina (20U/mL). O exudato obtido após a última aspiração foi depositado em tubos de 5 mL e deixado em repouso por 3 min para a sedimentação das partículas de Biogel. Após a sedimentação, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro tubo contendo 2 mL de PBS (diluição 1:5). Foram aguardados 2 min para a sedimentação das partículas para, em seguida, transferir 0,1 mL a um terceiro tubo contendo 0,4

mL de azul de metileno em ácido acético (azul de metileno 1% em álcool + ácido acético 1%). Aproximadamente 25 μL desta suspensão foram colocados em câmara hemocitométrica de Malassez para determinação da concentração celular. Os resultados foram expressos como número de células por mL de exudato.

3.4 Obtenção de células do sangue e da medula óssea

Amostras de sangue foram coletadas do plexo retro - orbital por meio de pipeta Pasteur embebida em Citrato de Sódio a 3%. O número de leucócitos e de hemácias foi determinado por meio de contagem em câmara hemocitométrica de Malassez. Para os leucócitos, foi feito uma diluição do sangue na proporção de 1:20 em azul de metileno 1% em ácido acético a 1%. Para o eritrograma as amostras foram diluídas 1:4000 em Citrato de Sódio a 3%. As extensões sanguíneas para a caracterização do tipo celular foram coradas com corante Panótipo. Utilizando a contagem total de leucócitos determinamos os valores absolutos de cada tipo celular.

As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral de uma das extremidades do fêmur e da tíbia com meio RPMI 1640 (SIGMA®). Foi utilizado o teste de exclusão com azul de tripan 1% para a contagem dos leucócitos em câmara hemocitométrica de Malassez. Os resultados foram expressos como número de células por mL. Alíquotas das suspensões foram utilizadas para preparação de lâminas em citocentrífuga para a determinação das subpopulações celulares presentes na medula óssea. Para tanto, 5×10^4 células/mL foram submetidas a citocentrifugação (800 rpm) por 5 min e coradas com Panótipo (Laborclin®). Foram analisadas no mínimo 200 células e determinada a porcentagem de cada população celular.

3.5 Dosagem das citocinas do exudato e do soro

As amostras de exudato foram coletadas conforme descrito no **item 3.3** e as conforme descrição no **item 3.4**. Para detecção de citocinas utilizando o aparelho Bioplex, o exudato e o soro foram obtidos a partir dos animais tratados em tempos variados de reação (1,5, 3 e 24 h) e animais controle injetados com 0,75 mL de

salina no dorso por 24 h. O ensaio com o kit *Milliplex®map* MCYTMAG-70K-PX32 (Mililipore Corporation, Billeria, MA, Estados Unidos) foi utilizado para a detectar simultaneamente, em um único poço, a quantificação de 32 citocinas e quimicionas de camundongos: Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFNy, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, , RANTES, TNF-α, VEGF.

A tecnologia MILLIPLEX map é baseada na Luminex®xMAP® que consiste em um processo que marca microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Por meio da utilização de concentrações precisas destas substâncias, podem ser criados até 100 conjuntos diferentes de microesferas, cada uma delas com uma assinatura baseada em um código de cores, que podem ser identificadas pelo instrimento Bioplex.

Para tanto, as amostras de exudato e soro foram previamente centrifugadas e mantidas a temperatura ambiente (TA) antes de iniciar o ensaio. Primeiramente, a placa foi lavada com 200 µL de tampão de lavagem por poço e mantida sob agitação por 10 min a TA e em seguida o conteúdo foi dispensando pela inversão da placa magnética. Foram adicionados 25 µL de cada padrão e controles nos poços apropriados segundo a indicação do fabricante. Adicionamos 25 µL de amostras do exudato ou soro não - diluídas (puro) nos poços apropriados. Logo após foram acrescentados 25 µL das microesferas em cada poço. As placas foram cuidadosamente seladas e incubadas *overnight*. No dia seguinte, o conteúdo foi cuidadosamente removido pela inversão da placa e realizado duas lavagens com 200µL de tampão. Adicionamos 25 µL dos anticorpos/poço de detecção e realizado uma incubação por 1 h. Acrescentamos 25 µL/poço de estreptoavidina PE e incubamos por adicionais 30 min. O conteúdo da placa foi removido e em seguida foram realizadas duas lavagens. Adicionamos 150 µL de “Sheath fluid” e a leitura foi realizada no aparelho Bioplex seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Contagem diferencial dos leucócitos

Os diferentes tipos de leucócitos circulantes ou das suspensões celulares da medula óssea foram reconhecidos por meio da coloração em lâminas. Uma pequena gota de sangue foi colocada sobre a lâmina e com o auxílio da borda de uma

segunda lâmina, em ângulo de 45° graus, fizemos uma extensão sanguínea que foi corada com panótipo rápido. Ao microscópio óptico com a objetiva de imersão percorreu - se campos contínuos em zigue-zague sendo contados no mínimo 200 leucócitos por amostra. A contagem diferencial dos leucócitos foi expressa em valores absolutos (tipo de leucócito/mm^3 de sangue) ou relativos (porcentagem do tipo de leucócito). A partir do valor relativo calculou-se o valor absoluto associando-se o valor relativo ao número total de leucócitos (MATOS, 1995).

3.7 Separação de células $CD5^+CD45R^+$(B220)$CD11b^+GR1^+Ter\text{-}119^+CD3^+$ da medula óssea (Depleção negativa)

Após a obtenção das células da MO, as suspensões foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de tampão auto MACS (Miltenyi Biotec®). Acrescentamos 10 µL do coquetel de anticorpos conjugados com biotina (anti-CD5, anti-CD45R(B220), anti-CD11b, anti-GR1, anti-CD3 e anti-Ter-119) do kit de depleção celular Lineage (Miltenyi Biotec®) na suspensão de $1x10^7$ células/160 µL. A suspensão foi mantida no gelo e ao abrigo da luz por 15 min. Após a primeira incubação acrescentamos 20 µL do coquetel de anticorpos anti-biotina (Clone: Bio3-18E7.2; mouse IgG1) conjugados com *microbeads* do kit de depleção celular Lineage (Miltenyi Biotec®) e as suspensões permaneceram no gelo por mais 15 min. Em seguida as suspensões celulares foram submetidas à separação celular nas colunas LS (2×10^9) no autoMACS®Proseparator (Miltenyi Biotec®). Após a separação das células negativas para os anticorpos do coquetel Lineage, as células utilizadas para a caracterização fenotípica por citometria de fluxo foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS 1x contendo soro fetal (2%).

3.8 Citometria de fluxo

Células viáveis da medula óssea total ou da cultura líquida foram utilizadas para análise por citometria de fluxo. Alíquotas de 100 mL das suspensões (10^7 células/mL) foram incubadas com anticorpo bloqueador de porção Fc CD16/CD32 (FcγIII/II, Clone: 93) por 10 min a 4 ^oC para, em seguida, serem submetidas às marcações com anticorpos monoclonais específicos dirigidos contra: granulócitos-

Ly-6G/Ly-6C (GR-1, clone: RB6), cadeia α de Mac-1 CD11b (clone: Mi/70), CD38 (clone 90), cadeia α do receptor de IL-3 (CD123, clone: 5B11), receptor de tirosina quinase c-Kit (CD117, clone: 2B8), CD34 (Clone: RAM34), linfócitos B-CD45R/B220 (Clone: RA3-6B2), neutrófilos-Ly-6G (Clone: IA8), Ly-6A/E (Sca-1, Clone: D7), cadeia β dos receptores de GM-CSF, IL-5 e IL-3 (CD131, Clone: JORO50), marcados com Ficoeritrina (PE) Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Piridina Clorifila (PercP-Cy5.5, Aloficocianina (APC) dependendo da associação desejada. Como Isótipos controles foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1). Todos os anticorpos foram obtidos da PharMingen. O registro de 10000 ou 50000 células foi adotado (dependendo do tamanho da população), utilizando FACS canto II e o programa Flow Jo® (Becton-Dickinson) para a análise.

3.9 Cultura das células da medula óssea em Metilcelulose e em meio líquido

Em condições estéreis, as células da medula óssea foram obtidas pela perfusão dos fêmures com meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de Glutamina, 1mM de Piruvato, Gentamicina (20 µg/mL), 50 µM de β-Mercaptoetanol e 10% de Soro Fetal Bovino inativado a 56 ^{o}C. Após homogeinização, as suspensões foram submetidas à lise das hemácias em tampão de lise (4,15 g de Cloreto de amônia, 0,84 g de Bicarbonato de Sódio e 1 mL EDTA 0,5M pH 8,0 em 500 mL de H_2O destilada) e, após centrifugação, foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. Na cultura líquida as células foram cultivadas na concentração de 5 x 10^5 células/mL em placas de 24 poços e estimuladas com os recombinantes murinos (Prepotec, Rocky Hill, NJ): 50 ng/mL de GM-CSF, 50 ng/mL de G-CSF, 20 ng/mL de SCF; 20 ng/mL de IL-3, 20 ng/mL de IL-5 e 20 ng/mL de IL-6, isoladamente ou em combinação com 10^{-7}M de Ácido Retinóico (All-Trans retinoic acid - ATRA, Sigma®). Após 5 dias de incubação a 37°C e 5% CO_2, as células foram descoladas com o uso de Tripsina 0,05% e EDTA 0,02%, recolhidas e diluídas em Azul de Trypan a 0,2 % para contagem em câmara hemocitométrica de Malassez.

Nos ensaios clonogênicos, para cada 1,5 mL de meio base de metilcelulose para camundongos (Methocult™ M3134® – Stem Cell Technologies) suplementado (600 µL de SFB, 25 µL de L-Glutamina, 450 µL gentamicina) foram homogeneizadas

com o auxílio de uma seringa de 3mL agulha (1,20 x 40 mm). As células na concentração final de 5 x 10^4 células/mL foram estimuladas com os recombinantes murinos (20 ng/mL de GM-CSF, 20 ng/mL de G-CSF, 10 ng/mL de IL-3) e cultivadas em placas de 1mL em duplicata para cada amostra. Após 7 dias de cultura as colônias CFU (Do inglês: [colony Forming Units]) foram contadas em microscópio óptico invertido.

3.10 Extração de RNA

A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280nm e a integridade e a boa qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em TBE (Tampão Brometo de Etídio) ou por análise em equipamento Bionalyzer (RNA Integrity Number, RIN > 6.5). As células da MO foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS estéril gelado e em seguida submetidas ao processo de extração de RNA utilizando o kit Illustra RNAspin (GE Healthcare®). Foram adicionados 350 µL/amostra da solução RA1 para lise das células e, em seguida, o lisado foi filtrado em colunas que foram centrifugas a 9000 rpm. As condições do RNA foram ajustadas acrescentando-se 350 µL/amostra de etanol 70%. Os lisados celulares foram transferidos para coluna de ligação do RNA e imediatamente centrifugadas por 30 min a 8000 rpm. Para dessalinização da membrana foram acrescentados 350 µL/amostra da solução do tampão MDB. Após a centrifugação por 1’ a 9000 rpm o DNA foi tratado com DNase 1:10 e incubados por 15’ a temperatura ambiente. Após este período as colunas foram lavadas com o tampão RA2 e em seguida com o RA3. Após centrifugação por 2’ a 8000 rpm o RNA puro foi eluído com H_2O livre de RNase.

.

3.11 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 10 µL contendo 1µg do RNA foram adicionados a 1 µL de Oligo (dT) (50 µM), 2 µL de água livre de RNase e 1 µL de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). O conteúdo foi homogeneizado e submetido à temperatura de 65 ºC por 5 min e logo após mantido em gelo por 1 minuto. Em

seguida foram adicionados 4 µL de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl2), 1 µL de DTT (0,1M) e 1µL da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase-Invitrogen (200 U/mL). As amostras foram aquecidas a 50 ºC por 50 min e as reações foram inativadas a 70 ºC por 15 min. As amostras foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.12 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em tempo real

Avaliamos a quantidade de RNA mensageiro dos genes expressos nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin. A cada amostra de cDNA foram adicionadas as sequências de *primers* (5 µM); 12 µl do Platinum SYBR Green qPCRSupermix-UDG (Invitrogen), e água para ajustar o volume final de reação em 25 µl por tubo. As reações foram incubadas no aparelho Chromo4 (MJ Research), e submetidas a uma fase inicial de incubação a 50 ºC por 2 min, seguido da fase de ativação da enzima (“hot start”) 95 ^{o}C por 5 min. As sequências alvo foram então amplificadas durante 50 ciclos constituídos de etapas sucessivas de denaturação (95 ^{o}C por 20 segundos) e de anelamento (60 ^{o}C durante 35 segundos). A aquisição da fluorescência incorporada ao material dupla - fita, amplificado a cada ciclo, foi efetuada na etapa de extensão.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase “Melt” onde a temperatura variou de 55 °C a 95 °C. A fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou denaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03”, conforme indicado.

3.13 Cálculo da expressão relativa

Esse sistema detecta o aumento da quantidade de fitas de DNA marcado com SYBR Green, molécula fluorescente. À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico, é detectada a cada ciclo e enviada para uma

unidade processadora. A cada amostra, é atribuído um valor de cT (*CycleThreshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo. A expressão relativa de RNAm dos genes alvos foi calculada pelo método comparativo de cT. A quantidade de gene alvo foi normalizada pelo gene controle endógeno Ciclofilina para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser aquele cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI et al., 2001). As diferenças nos valores de cT (ΔcT) foram calculadas para cada amostra de RNAm pela média dos cT das duplicatas:

$$\Delta cT = cT_{(gene\ alvo)} - cT_{(gene\ endógeno)}$$

A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o ΔcT das amostras em diferentes condições experimentais e o ΔcT do grupo controle (calibrador):

$$\Delta\Delta cT = \Delta cT_{(teste)} - \Delta cT_{(calibrador)}\text{: a expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta cT}$$

Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta cT}$. Como calibrador utilizamos o valor da média do ΔcT dos animais AIRmin basais, pois estes apresentaram o maior valor de ΔcT, indicando menor expressão gênica. As sequências dos primers utilizados nos experimentos de expressão gênica estão relacionadas na **tabela 2**.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de qPCR

Gene	Primer(5' - 3')
Ciclofilina	F: AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT
	R: AAATGCCCGCAAGTCAAAAG
Cebpα	F: CCATGTGGTAGGAGACAGAGACCTA
	R: CTCTGGGATGGATCGATTGTG
Cebpβ	F:ACACGCCACCGGGTTTC
	R:CAACCCCGCAGGAACATC
Pu.1	F: TGTTACAGGCGTGCAAAATG
	R: TCATGCATTGGACGTTGGTA
Gcsfr	F: TATGCTAGGGTCCAGCGAAGT
	R: GAGACTACATCAGGGGCCAATG
Gmcsfrα	F: CCACGGAGGTCACAAGGTCA
	R: ACTCGCACGTCGTCGGACAC
Mcsfr	F: ACAACACCCCCAATGCTAAC
	R: TCATGGAAAGTTCGGACACA
Il3rα	F: GCGGAACAGATTCCACCAT
	R: GACTTGACCCGGAAGGAGAT
Il3rβ	F: CGATTTTCCATCACAAACGA
	R: ATGCTGACGTTCTTGGGAAG
Dpp4	F: CACCGTGGAAGGTTCTTCTG
	R:GAATACGTTCTGCGGCTGTC

3.14 Quantificação do conteúdo proteico total das células da medula óssea

As células da medula óssea foram submetidas ao processo de extração proteica que consiste na lise celular com tampão contendo 8M de uréia, 4% de CHAPS, 40 mM de Tris base e 40 mL de H_20 destilada) que ao ser adicionado aos poços de cultura obtêm-se o lisado celular. Este lisado é submetido à centrifugação a 12500 g por 10 min e os sobrenadantes obtidos e congelados à -80 ^{o}C. Foi determinada a concentração protéica pela técnica de BCA (Ac. Bincicônico), utilizando placa de 96 poços. Alíquotas de 25 mL de concentrações decrescentes de

BSA (Albumina Sérica Bovina) foram adicionadas na placa para determinar a curva padrão. As amostras foram então diluídas seriadamente na razão 2. Após adição dos reagentes a placa foi transferida para a estufa à 37 ºC e incubada por 30 min. Decorrido este tempo as densidades óticas das amostras foram determinadas a 520 nm (Labsystem®). Baseado na curva padrão, podemos determinar a concentração protéica das amostras.

3.15 Análise de proteínas em gel SDS-PAGE de duas dimensões (2D)

As amostras de proteínas obtidas das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad®) e aplicados 150 μg ao terminal catódico de membranas de gel de gradiente imobilizado de pH (*immobolized pH gradient gel* IPG, Pharmacia Biotech®) na faixa de pH 3 a 10. As fitas foram re-hidratadas por 18 h à temperatura ambiente, utilizando tampão de re-hidratação (8 M de uréia, 1M de DTT, 2% de CHAPS e 0,5%de tampão IPG) e a eletro-focalização foi realizada por 18-20 hs a 32000 Vh, utilizando uma unidade IPGphor (Amershanbioscience®). Em seguida, os géis foram equilibrados por 10 min em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6 M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 100 mg DTT (Dithiothreitol) e por mais 10 min em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6 M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 250 mg de iodoacetamida. Para a eletroforese na segunda dimensão, as fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em sistema Hoefer SE600 (Amersham Pharmacia®) o qual foi submetido a uma corrente elétrica de 600 V - 30 mA por 1 h e em seguida 600 V – 80 mA por aproximadamente 5 h.

3.16 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata

Os géis foram fixados com 50% de metanol / 12% de ácido acético e formaldeído 37% e mantidos *overnight*. Após a fixação, os géis foram lavados com uma solução de 30% de etanol durante 1 minuto no forno de microondas e mantidos sob agitação à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, os géis foram

sensibilizados por 1 minuto no forno de microondas com uma solução de 0,02% de tiosulfato de sódio e agitados à temperatura ambiente por 2 min. Após a sensibilização, os géis foram lavados 2x com água destilada e incubados em 0,2% de nitrato de prata por 30 segundos em forno de microondas e 5 min no agitador à temperatura ambiente. Foi realizada mais uma lavagem com água antes de acrescentar uma solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio. Por fim, a reação foi interrompida com 12% de ácido acético e 50% de metanol. As imagens dos géis foram obtidas no ImageScanner III(GE Healthcare®).

3.17 Análise Estatística

As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA, considerando níveis significativos àqueles inferiores a 0,05, bicaudal.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da resposta inflamatória aguda após injeção s.c de Biogel P-100®

Ao longo do processo de seleção genética bidirecional para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda, os camundongos AIRmax e AIRmin aumentaram progressivamente a diferença fenotípa interlinhagem, sendo observado, na 30ª geração, uma diferença de aproximadamente 20 vezes para o número de leucócitos migrantes e 2,5 vezes para a concentração proteica após 24 h da injeção s.c de Biogel P-100® (BIOZZI et al., 1998).

Com o intuito de verificar se os animais AIRmax e AIRmin mantêm os fenótipos de alta ou baixa reatividade inflamatória aguda e também avaliar a mobilização das células da MO para o sítio inflamatório, iniciamos o presente estudo avaliando a resposta inflamatória dos animais AIRmax e AIRmin nas primeiras 24 h da administração do Biogel P-100®. Para tanto, avaliamos após $1^{1/2}$, 3, 6, 12 e 24 h da injeção de Biogel P-100® por meio da contagem do número e morfologia dos leucócitos totais migrantes para o sítio inflamatório e por meio da caracterização por citometria de fluxo e análise citológica.

Na **Figura 7A** observamos que o número de células presentes no local da inflamação nas primeiras 6 h de reação foi baixo e equivalente nas duas linhagens. Os animais AIRmax apresentaram um aumento progressivo do infiltrado de células no sítio inflamatório a partir de 6 h de inflamação (9,35 ± 2,57 x 10^6/mL ± ep), atingindo valores de 96,85 ± 8,86 x10^6/mL ± ep às 24 h. Este aumento de celularidade no sítio inflamatório dos animais AIRmax determinou uma diferença significativa interlinhagem após 24 h de biogel, com níveis de aproximadamente 9 vezes superior no exudato dos animais AIRmax (96,85±8,86 x 10^6/mL ± ep) em relação aos animais AIRmin (10,77 ± 4,6 x10^6/mL ± ep)(**Figura 7A**). Desta forma, os resultados observados nestes experimentos confirmaram aqueles descritos anteriormente que demonstraram que os fenótipos extremos de alta ou baixa capacidade inflamatória, respectivamente nos animais AIRmax e AIRmin quando stimulados com Biogel P-100® (BIOZZI et al., 1998; IBAÑEZ et al., 1992).

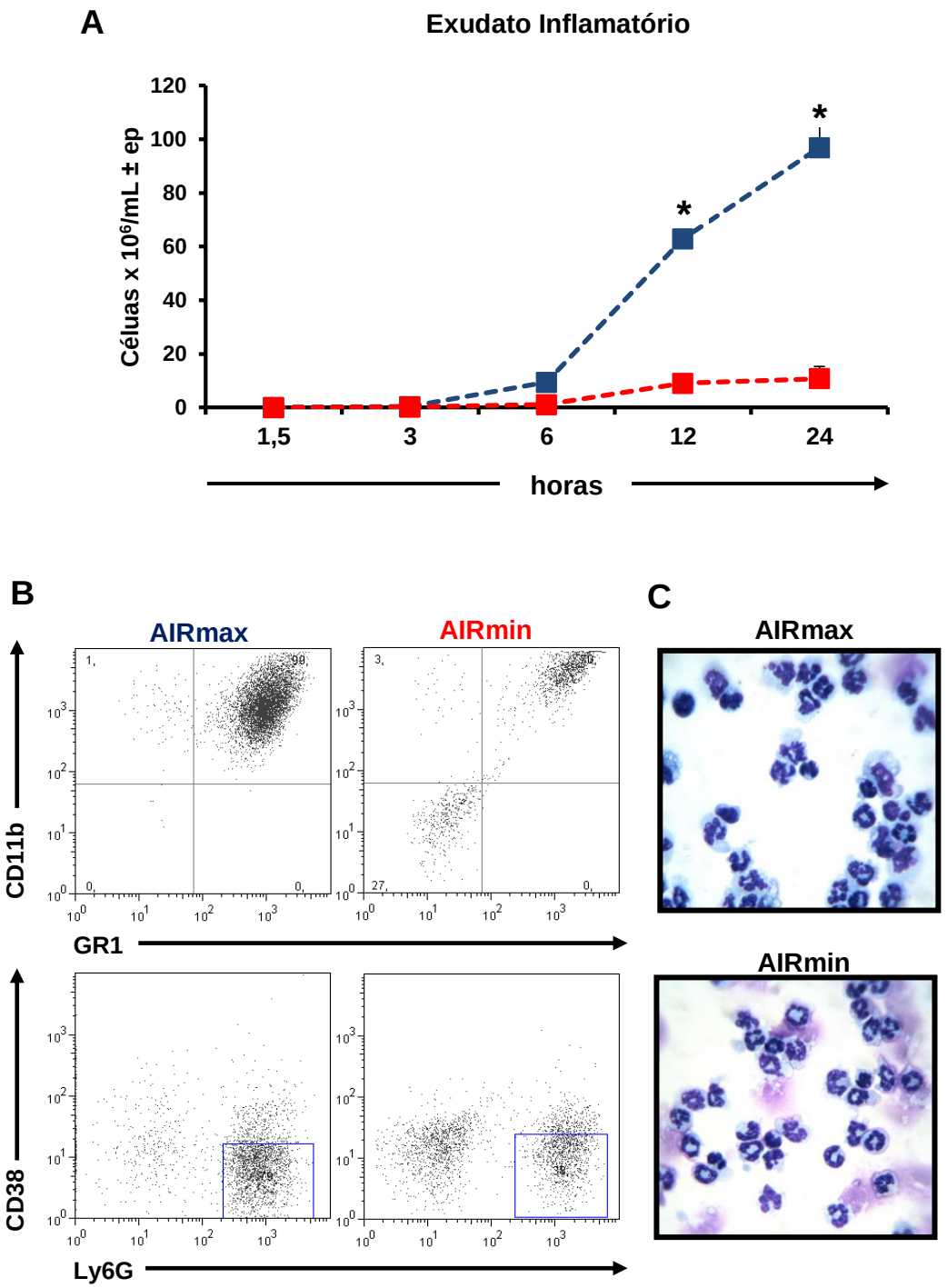
Para a caracterização das populações celulares, além da identidicação em preparações citológicas foram utilizados anticorpos dirigidos às moléculas Ly6G, GR1, CD11b e CD38 em ensaios de citometria de fluxo e das células presentes no exudato inflamatório. 24 h após o tratamento com Biogel P-100®. Foi realizada a

aquisição em citômetro de fluxo e os dados foram analisados utilizando o programa Flow Jo®.

A **figura 7B** refere-se aos citogramas representativos da associação dos anticorpos dirigidos às moléculas CD11b e GR1, os quais possibilitam a identificação de populações macrofágicas/neutrofílicas e a combinação de anti-CD38 e anti-Ly6G a identificação da fase terminal de maturação granulocítica. A expressão da molécula CD38 é observada em uma variedade de células imaturas humanas e murinas com alto potencial de renovação e diferenciação. Nas células progenitoras mielóides murinas, os altos níveis de expressão de CD38 decrescem ao longo da maturação até a sua perda de expressão na membrana dos neutrófilos terminalmente diferenciados (LAGASSE; WEISSMAN, 1996; PARTIDA-SANCHEZ et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003).

Desta forma, nossos resultados demonstram que as células infiltrantes no exudato inflamatório após 24 h da indução da AIR, em ambas as linhagens, possuem fenótipos $CD11b^{+}GR1^{+}$ e $CD38^{neg}Ly6G^{+}$, ou seja, neutrófilos maduros. Estes dados foram confirmados pela análise citológica em lâminas coradas com panótipo rápido (**Figura 7C**).

Figura 7 - Infiltrado leucocitário no sítio de injeção de Biogel P-100®



(A) - Número de leucócitos totais no exudato inflamatório após 1h30 min (n=5), 3 h (n=6), 6 h (n=6), 12 h (n=6) e 24 h (n=5) da injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). **(B)** – Citogramas representativos das populações celulares evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície CD11b/GR1 e CD38/Ly6G. **(C)** – Morfologia das células presentes no tecido subcutâneo dos animais AIRmax e AIRmin. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.2 Quantificação de citocinas, fatores de crescimento e quimicionas no exudato

A indução da AIR nos camundongos AIRmax e AIRmin nos confirmou uma diferença, a favor dos animais AIRmax, de aproximadamente 9 vezes quanto ao aporte de células para o sítio inflamatório. Dentre todos os mediadores inflamatórios envolvidos, as citocinas e quimiciocinas produzidas localmente regulam, além de outros fatores, os eventos iniciais da inflamação aguda exercendo, assim, um importante papel na regulação da mielopoese emergencial (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

Portanto, com o objetivo de caracterizar a produção dos fatores hematopoéticos, citocinas e quimicionas na resposta inflamatória aguda, avaliamos a produção de G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1b, IL-6 e IL-10 (**Figura 8**) e KC, LIX, MIP-2 e CXCL10 (**Figura 9**), além de outras 22 citocinas (**Tabela 8 - Anexo A**). Para tanto, coletamos o exudato inflamatório nos diferentes tempos de indução da AIR com Biogel P-100® bem como dos animais controles tratados com salina pelo período de 24 h.

Nossos resultados demonstraram um perfil semelhant na produção de G-CSF e GM-CSF no exudato. Verificamos que nos primeiros períodos da AIR (3 h) a concentração de G-CSF foi de 1236,2 ± 11,2 pg/mL e GM-CSF foi de 51,1 ± 12,5 pg/mL nos animais AIRmax, valores significativamente superiores aos respectivos controles tratados com salina cujos valores foram de 55,1 ± 4,5 pg/mL e 2,4 ± 2,3 pg/mL, respectivamente. No período de 24 h, ambas as linhagens apresentaram aumento significativo destes fatores hematopoéticos, mostrando nesse momento uma diferença significativa interlinhagem a favor dos animais AIRmax (**Figura 8A** e **8B**).

Observamos que outro importante fator de crescimento de células mielóides, o M-CSF, não apresentou diferença significativa interlinhagem, porém, os níveis desta citocina após 24 h de AIR foram de 62,5 ± 6,0 pg/mL e 50,7 ± 8,5 pg/mL, respectivamente em AIRmax e AIRmin, significativamente superiores aos controles cujos valores foram de 2,9 ± 2,4 pg/mL nos animais AIRmax e 0,14 ± 0,01 pg/mL nos animais AIRmin (**Figura 8C).**

Observamos que a inflamação induzida pelo Biogel P-100® propiciou, apenas nos animais AIRmax , o aumento da produção de IL-1b, IL-6 e IL-10. Desta forma, no período de 1,5 h ocorreu o aumento de IL-10 (31,6 ± 9,5 pg/mL), apresentando níveis ainda maiores no tempo de 3h (60,0 ± 4,0 pg/mL) (**Figura 8F**). Neste último período também verificamos altos níveis de produção de IL-6 (5171,3,6 ± 1790,1 pg/mL) e que, no mesmo sentido, aumentou progressivamente atéo período de 24 h (12347,4 ± 1264,09 pg/mL) (**Figura 8E**). Além disso, às 24 h também observamos um aumento significativo de IL-1b nesta linhagem (**Figura 8D**). Comparativamente entre AIRmax e AIRmin, verificamos diferenças interlinhagens significativas quanto à produção de IL-10 já no período de 3h, e de IL-1b e IL-6 no tempo de 24 h (**Figura 8D** e **8E**).

Referente à produção de quimicionas no exudato, verificamos que nas primeiras horas (1,5 h) de indução da AIR pelo Biogel P-100® houve o aumento significativo de KC (758,6 ± 121,6 pg/mL) em relação aos controles (7,63 ± 7,4 pg/mL) nos animais AIRmax, ao passo que, nos animais AIRmin este aumento foi um pouco retardado, observado no período de 3 h. Em adição, observamos que duas outras quimicionas atraentes de neutrófilos, MIP-2 e LIX, apresentaram um aumento significativo, comparados aos seus controles, apenas nos animais AIRmax. Após 24 h da injeção de biogel estas quimicionas mostraram-se diferentes entre as duas linhagens, com concentrações maiores nos animais AIRmax (**Figuras 9A, 9B** e **9C**).

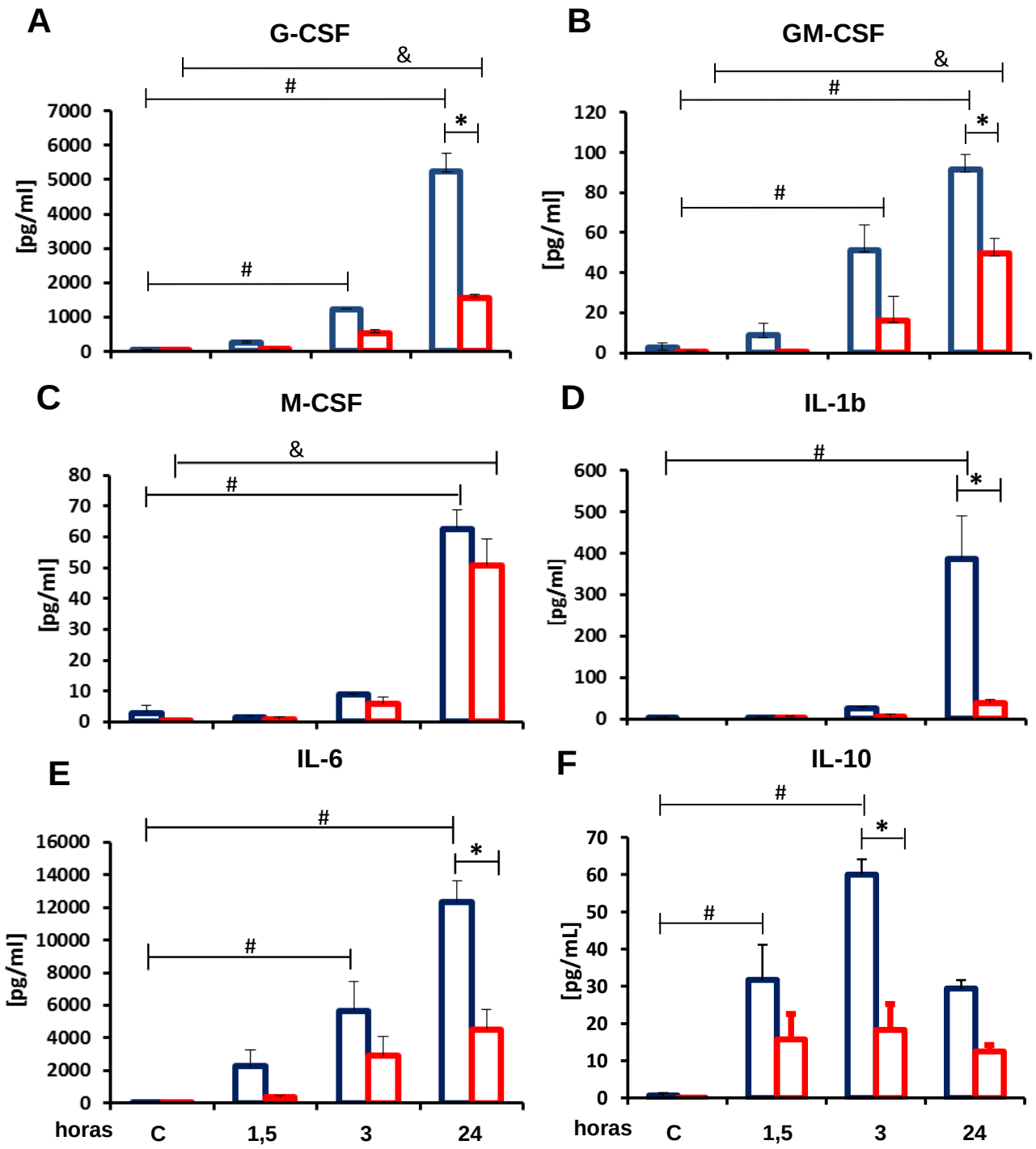
Contrariamente, a quimiocina CXCL10, responsável por atrair monócitos/macrófagos, apresentou concentrações superiores nos exudatos dos animais AIRmin (**Figura 9D).**

Conjuntamente, pudemos constatar que nas primeiras horas após a indução da resposta inflamatória ocorre, majoritariamente nos animais AIRmax, a produção de fatores de crescimento essenciais para a mielopoese (G-CSF e GM-CSF), citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-10) e quimioatrantes de neutrófilos (KC e MIP-2).

Referente às outras 22 citocinas avaliadas, observamos que os níveis de IL-1α, IL-4, IL-5, IL-7, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, LIF, MCP-1, MIG, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α, VEGF e eotaxina foram semelhantes entre os animais AIRmax e AIRmin controles. Dentre estas apenas a eotaxina, IL-13 e MIG não demonstraram diferença significativa interlinhagem durante os períodos avaliados. Entretanto,

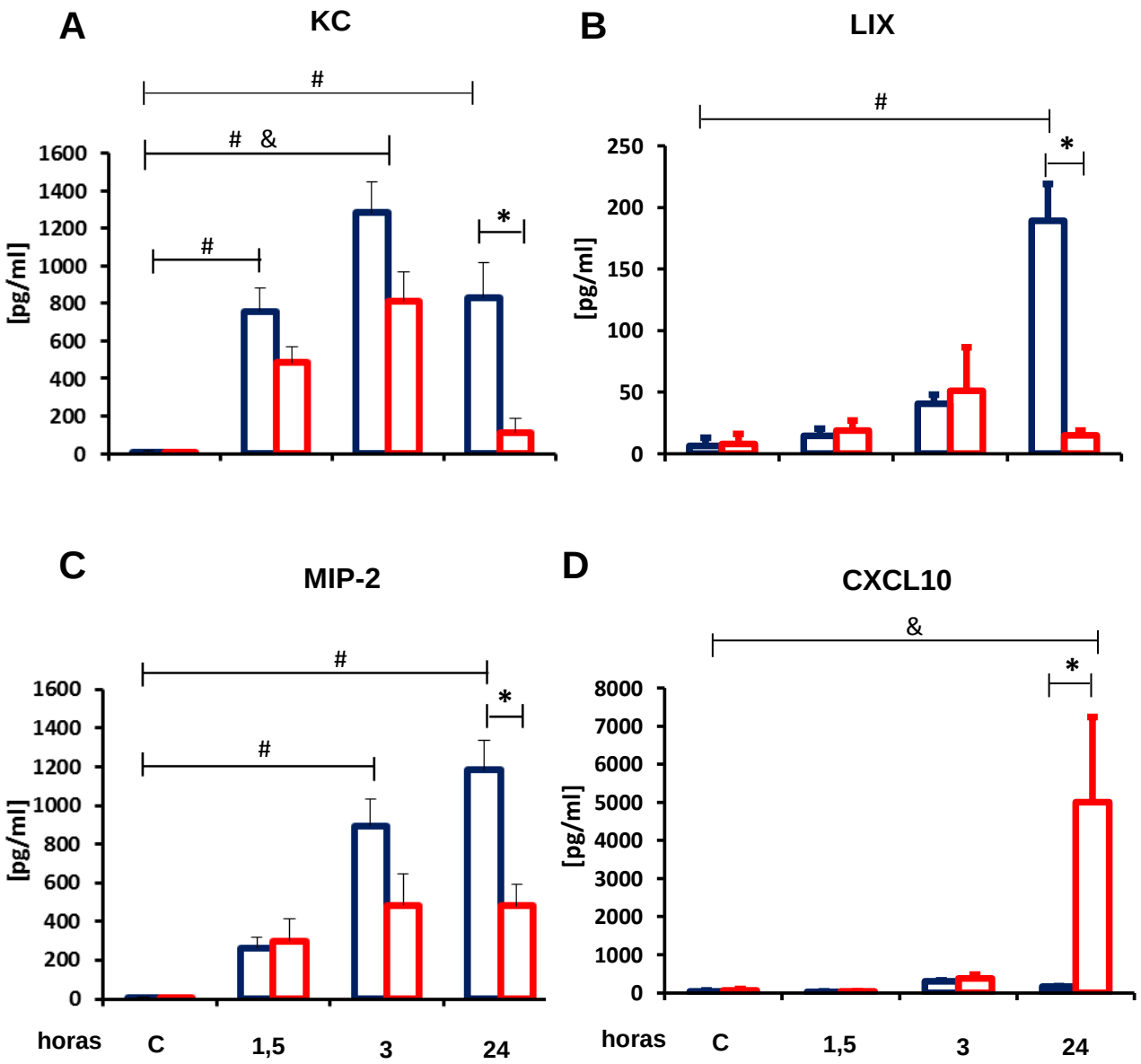
quando avaliamos dentro de cada linhagem o aumento da produção destes fatores em resposta a indução da inflamação, verificamos que após 3 h ocorre o aumento de eotaxina, IL-5, IL-7, IL-12p70 e MCP-1 e após 24 h o aumento de IL-1α, IL-4, IL-13, IL-15, IL-17, MCP-1, MIG, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α e VEGF na linhagem AIRmax em relação aos seus controles basais. Ao passo que os animais AIRmin demonstraram após 24 h o aumento da produção de eotaxina, IL-5, MIG, MIP-1β e RANTES quando comparados com os animais controle (**Tabela 8 do anexo a)**.

Figura 8 - Citocinas e fatores de crescimento hematopoético no exudato em períodos variados após a injeção de Biogel P-100®



Níveis de **(A)** – G-CSF, **(B)** – GM-CSF, **(C)** – M-CSF, **(D)** – IL-1b, **(E)** – IL-6 e **(F)** – IL-10 nos animais em condições basais (n=3), 1h30 min (n=4), 3 h (n=4) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■).Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e AIRmax tratados com Biogel P - 100® e (&) AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P - 100® $p<0,05$. Resultados de 1 experimento

Figura 9 - Quimiocinas no exudato



Níveis de **(A)** – KC, **(B)** – LIX, **(C)** - MIP-2 e **(D)** – CXCL10 nos animais em condições basais (n=3), 1h30min (n=4), 3h (n=4) e 24h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■).Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e AIRmax tratados com Biogel P - 100® e (&) AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P - 100®. p<0,05. Resultados de 1 experimento.

4.3 Celularidade no sangue periférico na resposta inflamatória aguda

Verificamos, até o momento, que a indução da resposta inflamatória pelo Biogel P-100 induziu uma alta migração de neutrófilos maduros nos animais AIRmax e, além disso, que a resposta inflamatória foi acompanhada pelo aumento da produção dos fatores estimuladores de crescimento mielóide, citocinas inflamatórias e quimicionas.

Sabe-se que os fatores solúveis, principalmente o G-CSF e a IL-1b, atuam rompendo a interação responsável pela retenção dos neutrófilos na MO (CXCL12 e seu receptor CXCR4). Consequentemente, a ação destas citocinas, além de outras, no microambiente medular, promove: uma a rápida mobilização da reserva de neutrófilos; redução do tempo médio do trânsito dos leucócitos a partir da MO para o sítio de injúria e aumento da sobrevivência dos neutrófilos maduros na circulação, consequentemente, refletindo no número aumentado de neutrófilos no sangue periférico (COLOTTA et al.,1992; FURZE; RANKIN, 2008; LORD et al., 1989).

Para avaliar o efeito da resposta inflamatória no número de leucócitos e eritrócitos no sangue periférico, coletamos amostras de sangue do plexo retro-orbital dos camundongos AIRmax e AIRmin em condições basais e após a indução da AIR e, em seguida determinamos o número total de leucócitos por contagem em câmara de malassez.

Para o número médio de leucócitos totais circulantes, no período de 24 h do tratamento com Biogel P-100®, observamos uma significante diferença interlinhagem, bem como entre os animais AIRmax em relação aos seus respectivos animais em condições basais (**Figura 10A**).

A população de neutrófilos circulantes após a indução da AIR foi caracterizada pela dupla marcação com os anticorpos anti-CD11b e anti-GR1. Ao longo do processo de maturação dos neutrófilos na MO, a expressão das moléculas CD11b e GR1 aumenta progressivamente, sendo observado diferentes níveis de expressão destas moléculas de acordo com o estágio de maturação granulocítica. A inflamação pode acarretar a mobilização de granulócitos indiferenciados, ou até mesmo células - tronco e progenitoras, da MO para a circulação (HESTDAL et al., 1991; LAGASSE; WEISSMAN, 1996; LEPIDOT; PETIT, 2002; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

Na **Figura 10B,** representamos os citogramas referentes à porcentagem de células $CD11b^{+}GR1^{+}$ do sangue periférico oriundas dos animais AIRmax e AIRmin em condições basais e após 3 h do estímulo com Biogel P-100®. Em azul destacamos a população $CD11b^{+}GR1^{+}$ na qual observamos maior proporção destas células nos animais AIRmax, tanto basais quanto após a inflamação. Além disso, as setas vermelhas indicam uma população de granulócitos indiferenciados ($CD11b^{+}GR1^{low}$) presente apenas nos animais AIRmax após o estímulo inflamatório.

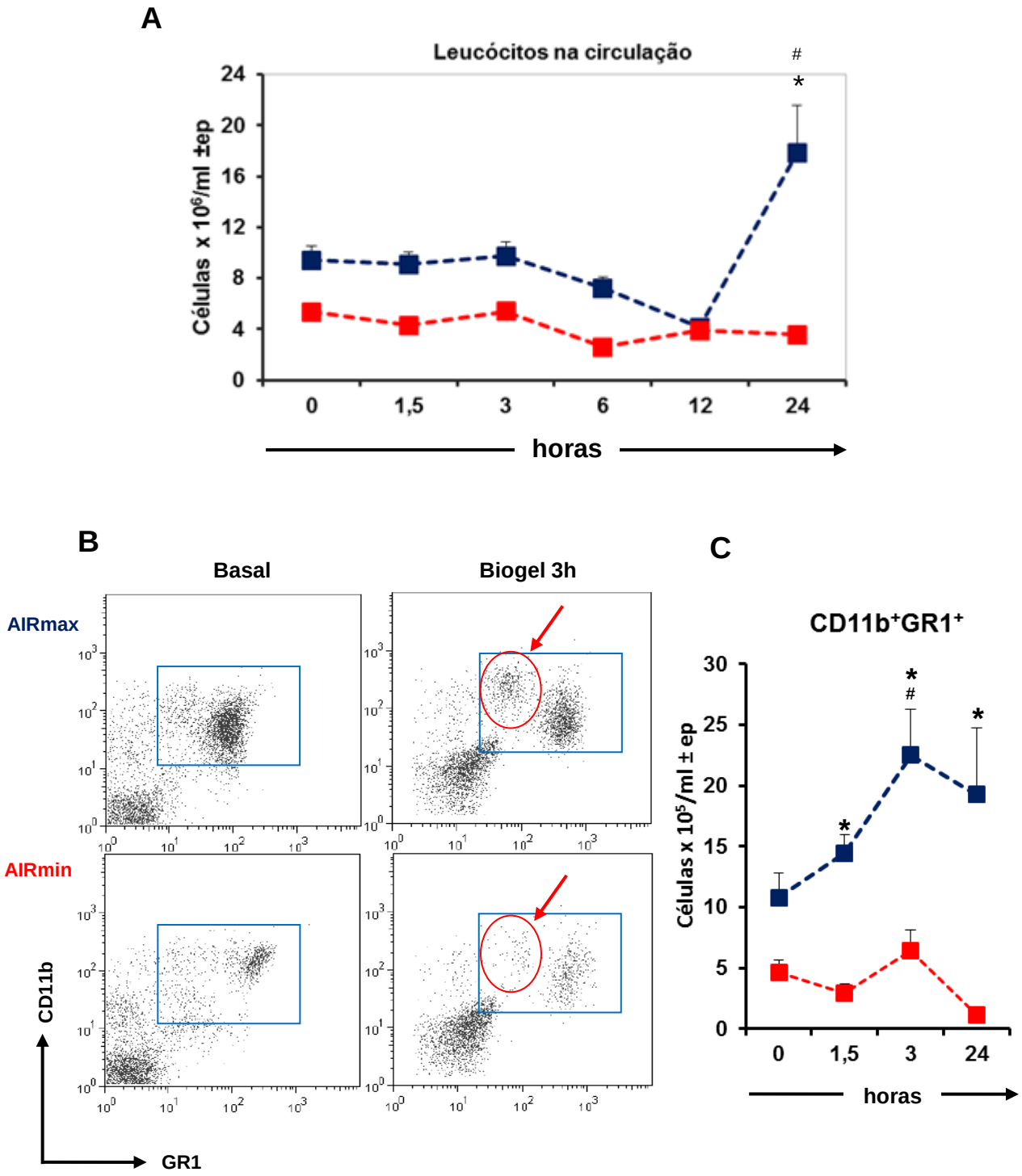
A partir das porcentagens verificadas nos citogramas ilustrados na **Figura 10B** calculamos os valores absolutos de células $CD11b^{+}GR1^{+}$ demonstrados na **Figura 10C**. Estes resultados demonstram que em condições basais os animais AIRmax e AIRmin não apresentam diferença significativa no número de neutrófilos circulantes. No entanto, após o estímulo com Biogel P-100® os animais AIRmax apresentaram aumento do número de neutrófilos já a partir de 1h30 min, apresentando diferença significativa em relação aos animais AIRmin em todos os períodos subsequentes. Este resultado indica neutrofilia induzida pelo Biogel P-100®.

Corroborando os dados apresentados na **Figura 10C,** a **Tabela 3** apresenta os valores da contagem diferencial de leucócitos por análise citológica, a partir das lâminas de extensão sanguínea. O mínimo de 200 células foram analisadas sendo a morfologia nuclear e coloração dos grânulos citoplasmáticos os parâmetros diferenciadores considerados.

Ao compararmos as proporções de células em AIRmax e AIRmin não tratados com Biogel, verificamos que não houve diferença interlinhagem. Por outro lado, no período de 3 h observamos que ambas as linhagens aumentaram a proporção de precursores granulocíticos e de neutrófilos diferenciados que às 24 h de estímulo com Biogel P-100®, observamos maior proporção destas células nos animais AIRmax foi significativamente maior.

Os resultados apresentados na **figura 11** demonstram que não houve alterações significativas no número de eritrócitos na circulação em ambas as linhagens, após a inflamação induzida pelo Biogel P-100®.

Figura 10 - Leucócitos na circulação



(A) - Número de leucócitos totais na circulação dos animais em condições basais (n=6), 1h30 min (n=5), 3 h (n=6), 6 h (n=6), 12 h(n=6) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). **(B) –** Citogramas representativos das populações celulares evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície CD11b/GR1 nos leucócitos do sangue periférico. **(C)** – Número absoluto de células $CD11b^{+}GR1^{+}$ na circulação. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e AIRmax tratados com Biogel P - 100®. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

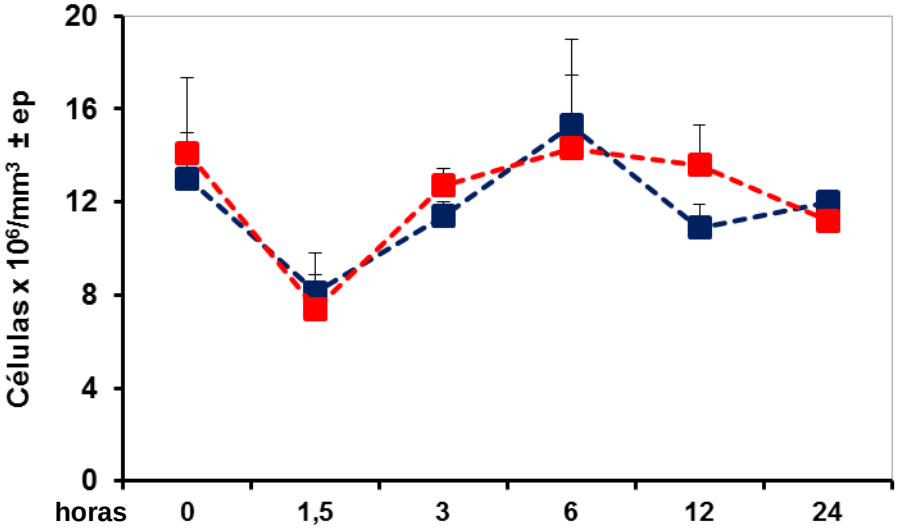
Tabela 3 - Porcentagem das populações de leucócitos na circulação por contagem diferencial.

Morfologia	***Grupos***							
	Basal		**Biogel 1,5h**		**Biogel 3h**		**Biogel 24h**	
	Max	**Min**	**Max**	**Min**	**Max**	**Min**	**Max**	**Min**
Progenitores de Granulócitos	1,3 ±0,4	0,0±0,0	2,6 ± 1,2	3,7 ± 0,5	5,5 ± 1,3	3,6 ± 0,9	8,6 ± 2,6	0,3 ± 0,1
Neutrófilos	33,6 ± 3,4	25,2 ± 3,7	35,8 ± 3,9	26,3± 8,6	45,0 ± 4,2	40,9± 5,1	25,8 ± 3,2	9,8± 3,3
Monócitos e macrófagos	5,8 ± 2,4	6,8 ± 2,4	18,3 ± 7,5	8,7 ± 2,3	10,8 ± 0,9	8,1 ± 1,1	6,8 ± 1,6	1,5 ± 0,2
Linfócitos	58,1 ± 3,8	66,9 ± 5,4	40,3 ±10,9	59,5± 5,6	37,5± 2,9	46,4 ± 5,0	58,3 ± 7,0	87,3 ± 3,0
Outros	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,3 ± 1,2	1,7 ± 0,1	1,08± 0,4	1,0± 0,4	0,3 ± 0,1	1,0± 0,4

Valores médios ± erro padrão. Grupo basal (n=7), biogel 1,5h (n = 4), biogel 3h (n = 6) e biogel 24h (n =4).

Resultados de 2 experimentos independentes.

Figura 11- Eritrócitos na circulação



Número de eritrócitos no sangue periférico nos animais em condições basais (n=6), 1h30 min (n=5), 3 h (n=6), 6 h(n=6), 12 h(n=6) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P - 100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.4 Dosagem de citocinas, fatores de crescimento e quimicionas no soro na vigência da resposta inflamatória aguda

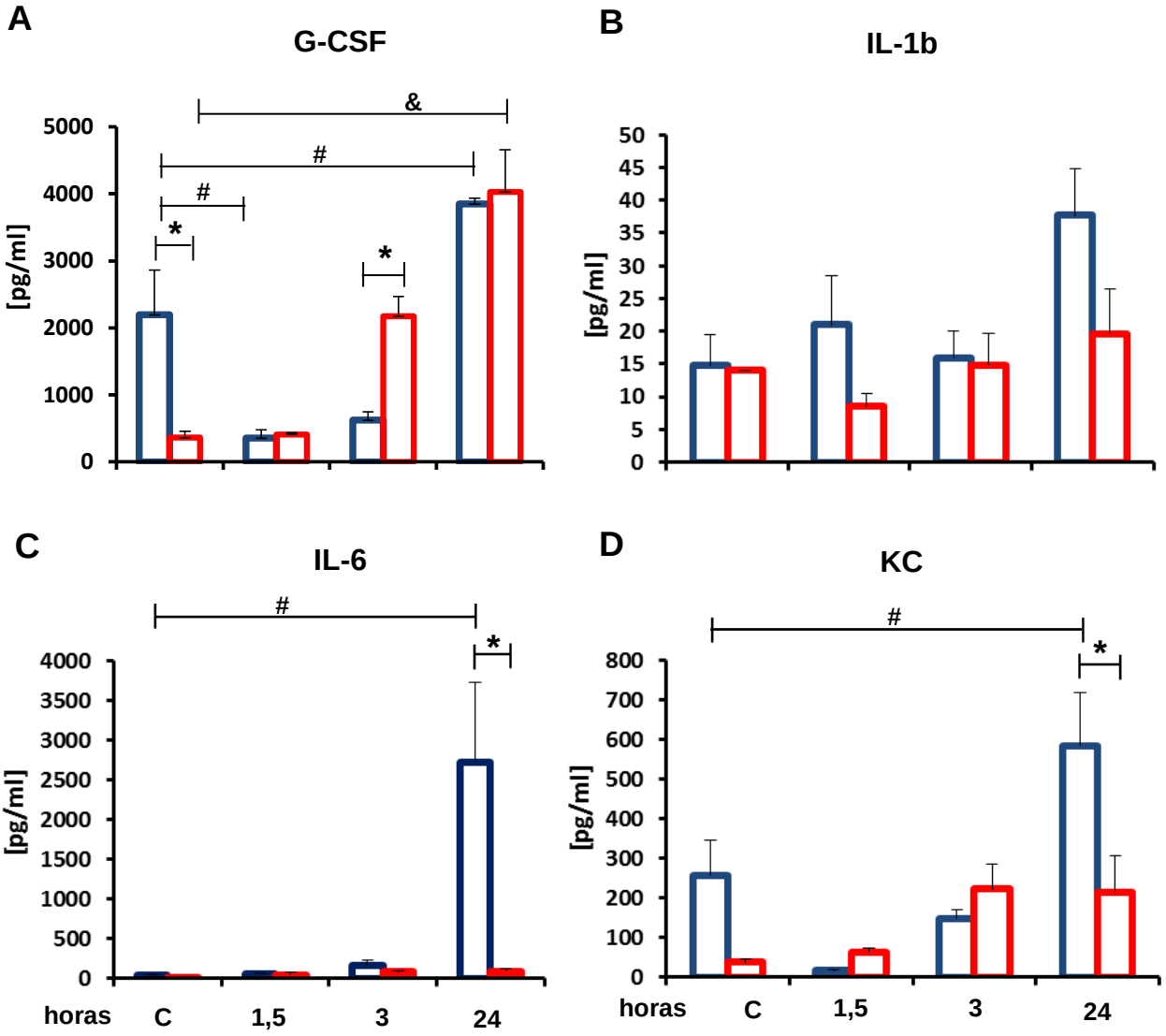
O próximo passo foi a dosagem dos níveis de citocinas no soro. Assim, as mesmas citocinas avaliadas no exudato foram avaliadas no soro nos diferentes tempos de indução da AIR com Biogel P-100®, e dos animais controles tratados com salina pelo período de 24 h.

A **tabela 8** do **anexo a** apresenta todos os valores para as 32 citocinas avaliadas. Na **figura 12** estão representados os resultados obtidos para as citocinas G-CSF, IL-1b, IL-6 e KC. Interessantemente, os níveis séricos de G-CSF mostraram diferença significativa entre AIRmax e AIRmin já nos animais, apresentando valores de 2139,5 ± 666,0 pg/mL e 360,3 ± 95,7 pg/mL, respectivamente. Entretanto, nos animais AIRmax, houve uma queda significativa destes níveis nos tempos de 1h30 min e 3 h da indução da inflamação (352,5 ± 125,8 pg/mL) seguido de aumento às

24h (3845,6 ± 87,2 pg/mL). Nos animais AIRmin, observamos maiores níveis desta citocina (2173,6 ± 291,8 pg/mL) em relação aos animais AIRmax (122,9 ± 127,0 pg/mL) no período de 3h e um aumento significativo às 24h (4026,2 ± 628,9 pg/mL) igualando aos animais AIRmin (**Figura 12A**).

As citocina IL-6 e a quimiocina KC tiveram perfis semelhantes com aumento significativo nos animais AIRmax, comparados aos seus controles, atingindo níveis significativamente mais elevados nos camundongos AIRmax após 24h da inflamação (**Figura 12C** e **12D**). Diferente do exudato inflamatório, a IL-1b sérica não apresentou diferenças significativas entre as duas linhagens linhagens tampouco qualquer alteração ao longo da cinética. No entanto, se considerarmos o baixo número de animais avaliados em cada linhagem (n =3), um aumento desta citocina às 24 h nos animais AIRmax poderia ser relevante (**Figura 12B**).

Figura 12 - Citocinas, fatores de crescimento hematopoético e quimiocinas no soro



Níveis séricos de **(A)** – G-CSF, **(B)** – IL-1b, **(C)** – IL-6 e **(D)** – KC nos grupos basais (n=3), 1h30min (n=4), 3h (n=4) e 24h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■).Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e AIRmax tratados com Biogel P - 100® e (&) AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P - 100® $p<0,05$. Resultados de 1 experimento.

4.5 Caracterização ex vivo das células da medula óssea durante a resposta inflamatória aguda induzida pelo Biogel P-100®

4.5.1 Cinética do número total de células

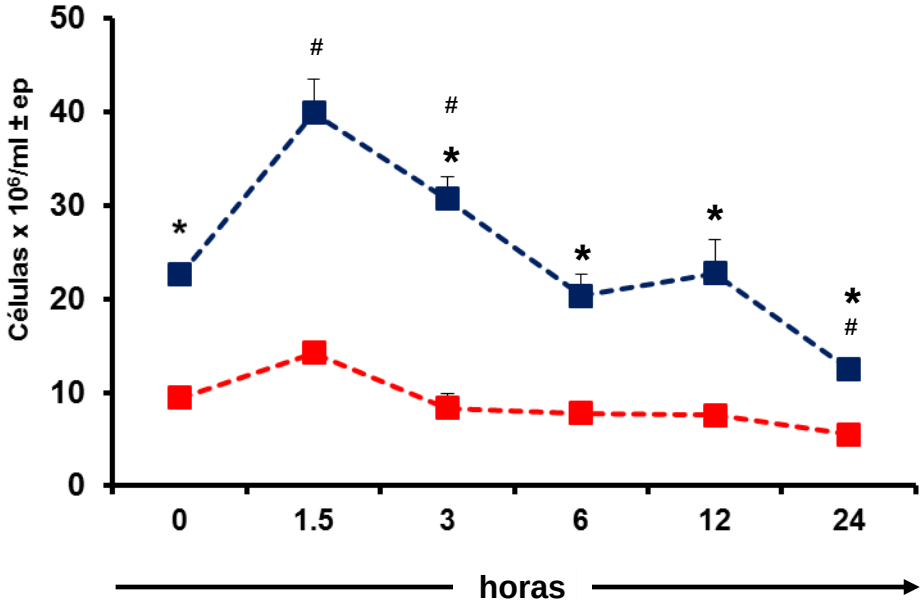
Avaliamos a dinâmica de produção de leucócitos pela medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin em condições basais e após tempos variados (1,$^{1/2}$, 3, 6, 12 e 24 h) da injeção s.c de Biogel P-100®. As células da MO foram obtidas por perfusão dos fêmures e em seguida, o número total de leucócitos foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica.. Os resultados foram expressos como a média do número de células por mL (**Figura 13).**

Verificamos nestes experimentos que já em condições basais ocorre uma diferença significativa no número de células da MO entre os camundongos AIRmax e AIRmin, com valores de 22,40 ± 1,21 x 10^6/mL e 9,40 ± 0,47 x 10^6/mL, respectivamente. No mesmo sentido, observamos diferenças significativas interlinhagem em todos os períodos avaliados da indução da resposta inflamatória.

Nos animais AIRmax, o aumento da produção de leucócitos após a inflamação em relação aos seus respectivos controles basais, foi significativo após 1h30 min e 3 h da injeção s.c de Biogel P-100®. Após estes períodos, uma diminuição na celularidade foi verificada, com queda significativa às 24 h, com valores de 12,5 ± 0,94 x 10^6/mL em comparação aos animais basais (22,60 ± 1,21 x 10^6/mL). Os animais AIRmin não mostraram qualquer alteração significativa no número de células da medula óssea em relação aos animais AIRmin basais ao longo da cinética.

Nestes experimentos podemos verificar que o estímulo com Biogel P-100® induziu a produção emergencial de leucócitos na MO dos animais AIRmax nas primeiras horas e, subsequente diminuição até 24 h do tratamento com Biogel P-100®, diminuição indicativa de mobilização dos neutrófilos para o sítio inflamatório.

Figura 13 - Células totais na medula óssea



Número de leucócitos totais na medula óssea nos grupos basais (n=40), 1 h 30 min (n=14), 3 h (n=12), 6 h (n=6), 12 h (n=6) e 24 h (n=17) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) entre AIRmax basal e AIRmax tratado com Biogel P-100®. $p<0,05$. Resultados de 4 experimentos independentes.

4.6 Granulopoese

Os granulócitos polimorfonucleares são o principal tipo celular presente nas fases iniciais da resposta inflamatória aguda. Estas células são mobilizadas da MO para o sangue periférico e, por apresentarem uma meia-vida curta, há a necessidade de serem constantemente produzidas a partir das HSPCs na MO a fim de manter o pool de neutrófilos na circulação (FURZE; RANKIN, 2008).

Para a caracterização das populações de granulócitos na MO, 1.10^7 células/mL foram marcadas com anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície CD11b; GR1; CD38 e Ly-6G, bem como os isótipos controles. Foi feita a aquisição em citômetro de fluxo, considerando 10000 eventos e os dados analisados no programa Flow Jo. Foram consideradas para análise as células viáveis por exclusão em marcação com Iodeto de propídeo (**Material e Métodos**).

Conforme a classificação de granulócitos da medula óssea de camundongos realizada por Ueda e colaboradores (2005) e MacNamara et al. (2011), pudemos no nosso modelo, identificar as sub-populações de granulócitos dos animais em condições basais e após a indução da inflamação pelo Biogel P-100®. Assim classificamos as seguintes populações:

1) $CD11b^{int}GR1^{low}$ promielócitos e mielócitos;
2) $CD11b^{high}GR1^{int\text{-}high}$ neutrófilos segmentados e
3) $CD11b^{low}GR1^{int\text{-}high}$ os metamielócitos e granulócitos com núcleo em anel.

Na **Figura 14A** está representado um citograma ilustrando as populações acima descritas. Os resultados apresentados na **Figura 14** representam os valores absolutos calculados a partir das porcentagens verificadas nos citogramas individuais para cada período avaliado. Verificamos que o número de granulócitos nas diferentes fases de maturação, não é diferente significativamente entre os animais AIRmax e AIRmin em condições basais. Em contrapartida, o número de granulócitos totais, ou seja, células $CD11b^{+}GR1^{+}$, foi significativamente diferente entre os AIRmax e AIRmin basais, com valores de 17,91 ± 2,9 x 10^6/mL e 4,08 ± 0,5 x 10^6/mL, respectivamente (ALBUQUERQUE; RIBEIRO – Resultados não publicados). O fenótipo de maior produção de granulócitos pela MO dos animais AIRmax já havia sido previamente demonstrado por estudos anteriores do nosso grupo (RIBEIRO et al., 2003).

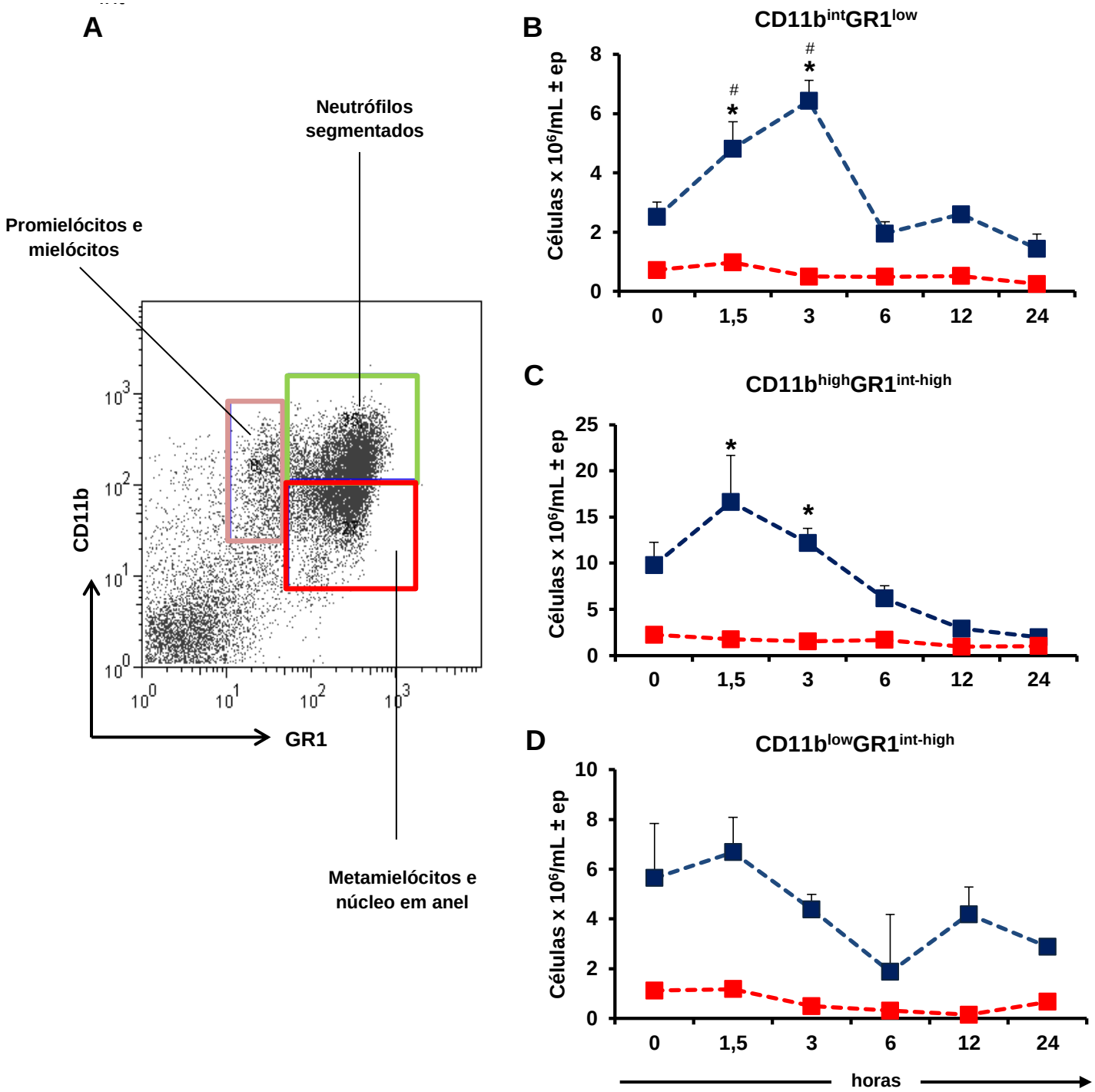
Em adição, diferenças significativas interlinhagem foram observadas para as populações de promielócitos/mielócitos e neutrófilos maduros após 1h30 min e 3h da injeção s.c de Biogel P-100® (**Figura 14B, 14C** e **14D**).

Com a associação dos anticorpos específicos para as moléculas CD38 e Ly-6G confirmamos a diferença significativa interlinhagem e intralinhagem (AIRmax basal versus AIRmax 1h30 min) no número de neutrófilos segmentados por meio da análise da população $CD38^{neg}Ly\text{-}6G^{+}$. Estes resultados estão representados na **Figura 15**.

Assim, a produção significativamente aumentada do número de granulócitos indiferenciados e neutrófilos maduros é um dos fatores importantes para caracterizar uma resposta emergencial ao estímulo inflamatório (Revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012). Estes fenótipos foram observados apenas nos animais AIRmax.

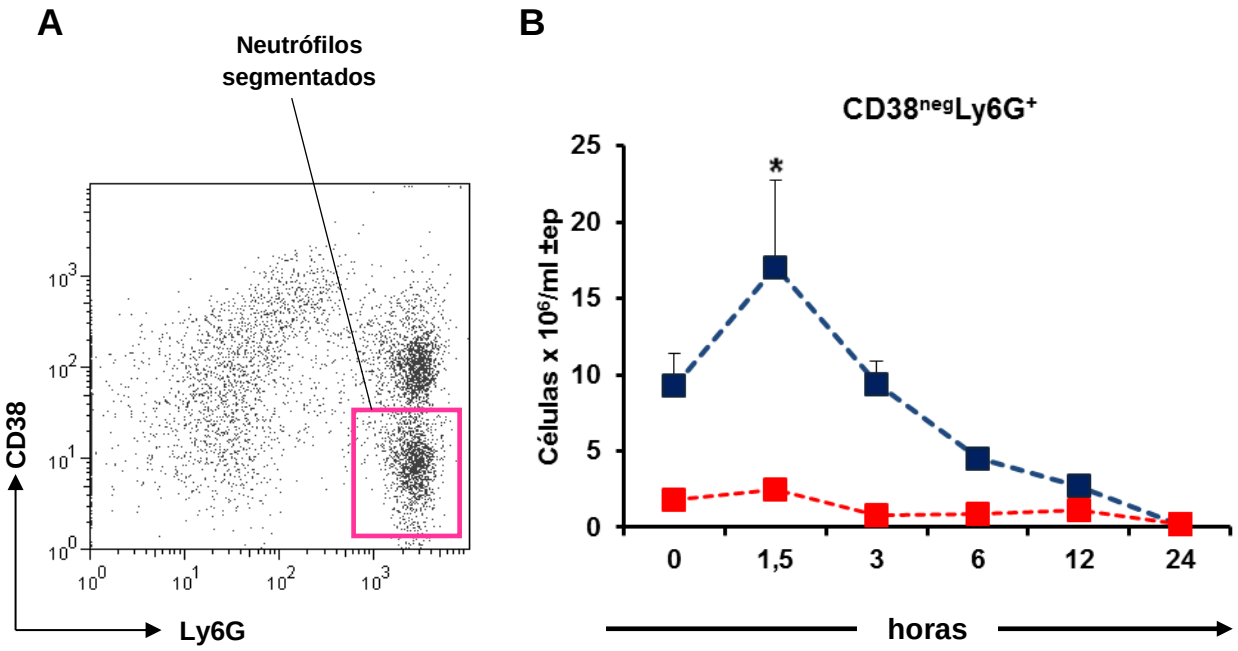
.

Figura 14 - Granulócitos na medula óssea



(A)- Citograma representativo das populações celulares evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície CD11b/GR1. **(B)** - Número absoluto de promielócitos e mielócitos ($CD11b^{int}GR1^{low}$), **(C)** - metamielócitos e neutrófilos com núcleo em anel ($CD11b^{high}GR1^{int\text{-}high}$) e **(D)** – neutrófilos segmentados ($CD11b^{low}GR1^{int\text{-}high}$) na medula óssea nos animais em condições basais (n=9), 1h30 min (n=8), 3 h (n=9), 6 h (n=6), 12 h (n=6) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100 no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P - 100®. p <0,05. Resultados de 2 experimentos independentes.

Figura 15 - Neutrófilos maduros na medula óssea



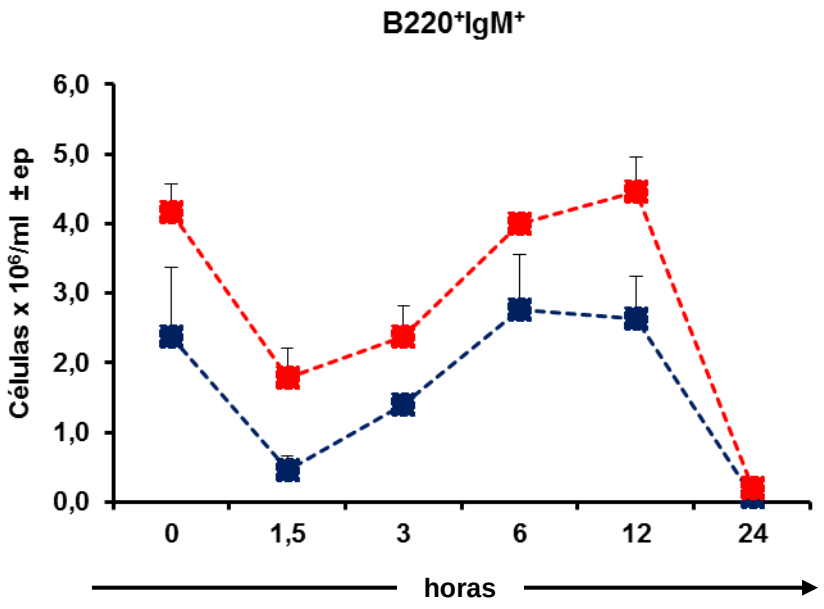
(A)- Citograma representativo das populações de neutrófilos segmentados evidenciada pela marcação $CD38^{neg}/Ly6G^{+}$. **(B)** – Número absoluto de neutrófilos segmentados na medula óssea nos animais em condições basais (n=8), 1h30 min (n=5), 3 h (n=6), 6 h (n=3)12 h (n=3) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P - 100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P - 100®. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.7 Linfopoese

Foi demonstrado que os neutrófilos e células B, ao longo do processo de proliferação e diferenciação na MO, competem por fontes específicas no microambiente medular, de maneira que a expansão da linhagem mielóide, em resposta a inflamação, resulta na diminuição compensatória das células B (UEDA; KONDO; KELSOE, 2005). Neste sentido, avaliamos a linfopoese nos animais AIRmax e AIRmin por meio da associação dos anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície IgM e CD45/B220, que permite a identificação das populações de linfócitos pró/pré B ($B220^{low}/IgM^{neg}$); imaturos ($B220^{low}/IgM^{high}$) e maduros ($B220^{high}/IgM^{high}$) na medula óssea (GALVAN et al., 2006). Neste estudo, classificamos o número absoluto de linfócitos $CD45/B220^{+}IgM^{+}$, ou seja, linfócitos imaturos e maduros da MO. Nossos resultados não demonstraram alterações significativas inter ou intralinhagem em resposta ao Biogel P-100®, de linfócitos B na MO, em nenhuma das condições avaliadas (**Figura 16**).

Considerando as diferenças significativas de celularidade na circulação e MO entre os camundongos AIRmax e AIRmin, anteriormente apresentados neste estudo, escolhemos os períodos de 1h30 min, 3 e 24 h da indução da resposta inflamatória aguda como tempos relevantes para nos aprofundarmos no estudo de alguns mecanismos celulares e moleculares participantes da mielopoese basal e emergencial nas linhagens AIRmax e AIRmin.

Figura 16 - Linfócitos na medula óssea



Número absoluto de linfócitos B na medula óssea nos animais em condições basais (n=8), 1h30 min (n=5), 3 h (n=6), 6 h (n=3), 12 h (n=3) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P - 100® no no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.8 Avaliação de células – tronco e células progenitoras hematopoéticas (HSPC) na resposta inflamatória aguda

A caracterização das populações de HSPCs murinas foi realizada pela combinação de alguns marcadores, onde foi possível classificá-las pela perda ou ganho destes marcadores de superfície. Desta forma, nos baseamos em alguns autores para a caracterização fenotípica das populações de progenitores de células mielóides: **HSC** (do inglês: [Hematopoietic Stem Cell]); **CMP** (do inglês: [Common Myeloid Progenitor]); **GMP** (do inglês: [Granulocyte-Macrophage Progenitor]) e **MEP** (do inglês: [Megacaryocite-Erytrocyte Progenitor]) (AKASHI et al., 2000; HERZOG, 2003; PRONK et al., 2008).

Primeiramente, as células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin foram marcadas com beads magnéticas ligadas a anticorpos específicos para depleção das células diferenciadas e maduras linhagem positivas (Lin^{+}). Com o auxílio do aparelho MACS pro separator (Myltenyi Biotec®), 1.107 células foram separadas em colunas LS MACS columns (Myltenyi Biotec®) e o eluente coletado. Para determinarmos a porcentagem de HSPCs após a separação imunomagnética, avaliamos por citometria de fluxo a expressão das moléculas de linhagem (CD5, CD45R/B220, CD11b, GR1 e Ter-119) e pudemos constatar que aproximadamente 30% das células recuperadas após depleção negativa não expressaram nenhum dos marcadores de linhagem. Portanto, este método de separação nos permitiu apenas um enriquecimento das HSPCs.

Na **Figura 17** está ilustrada a classificação das populações de HSPCs realizada neste trabalho. Por meio da associação dos anticorpos dirigidos às moléculas Sca-1(Ly-6A/E; c-Kit (CD117); FcyRIII/II (CD16/32) e CD34 determinamos o número absoluto (**Figura 18**) e as porcentagens (**Tabela 4**) das HSPCs, as quais foram classificadas como:

1) HSC – ($Lin^{neg\text{-}low}Sca\text{-}1^{+}c\text{-}Kit^{+}$);
2) CMP – ($Lin^{neg\text{-}low}Sca\text{-}1^{low}c\text{-}Kit^{+}FcyRIII/II^{med}CD34^{high}$);
3) GMP – ($Lin^{neg\text{-}low}Sca\text{-}1^{low}c\text{-}Kit^{+}FcyRIII/II^{high}CD34^{high}$);
4) MEP – ($Lin^{neg\text{-}low}Sca\text{-}1^{low}c\text{-}Kit^{+}FcyRIII/II^{+}CD34^{neg}$).

Os nossos resultados demonstraram que ao compararmos os animais AIRmax e AIRmin em condições basais, não observamos diferenças significativas quanto ao número absoluto e porcentagem de nenhuma das populações de progenitores avaliadas (**Figura 18** e **Tabela 4**).

Entretanto, no decorrer dos períodos de AIR avaliados pudemos constatar algumas mudanças importantes nas populações HSPCs na MO. Assim, no período de 1h30min da injeção s.c de Biogel P-100®, os animais AIRmax mostraram maior número de CMP (25,8 ± 4,1 x 10^5/mL) e GMP (44,7 ± 7,7 x 10^5/mL) em relação aos animais AIRmin (7,8 ± 1,0 x 10^5/mL e 12,1 ± 1,0 x 10^5/mL, respectivamente) no mesmo período de inflamação (**Figuras 18B** e **18C)**.

A seguir verificamos, apenas nos animais AIRmax, uma expansão significativa do número de CMPs (25,8 ± 4,1 x 10^5/mL) após 1h30 min da injeção s.c de Biogel P-100® quando comparado aos animais AIRmax basais (8,2 ± 1,7 x 10^5/mL) (**Figura18B**). No mesmo sentido, nossos resultados também indicaramm uma modulação no número de GMPs nos animais AIRmax tratados com Biogel P-100® com relação aos valores basais. Todavia, estes resultados não foram significantemente diferentes entre si no teste estatístico aplicado (**Figura18C**). Desta forma, podemos inferir a partir destes dados a ocorrência de um rápido aumento de progenitores mielóides em resposta ao estímulo inflamatório apenas nos animais AIRmax.

A partir do período de 3 h, os animais AIRmax mostraram uma acentuada diminuição de CMP (11,2 ± 5,0 x 10^5/mL) e GMP (19,6 ± 7,5 x 10^5/mL), não apresentando diferenças significativas entre as duas linhagens (**Figura 18B** e **18C**).

Além disso, observamos que ambas as linhagens apresentaram um aumento significativo dos progenitores MEPs após 1h30 min da indução da AIR em comparação com os valores de número absoluto dos seus respectivos animais basais (**Figura 18D)**.

Não observamos nenhuma alteração significativa na população de HSCs da MO dos camundongos AIRmax e AIRmin em nenhum dos períodos de AIR avaliados. No mesmo sentido, as porcentagens avaliadas não demonstraram diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin (**Tabela 4**).

Alterações no compartimento das HSPC na vigência da inflamação são descritas como uma resposta reativa do sistema hematopoético a fim de reconstituir

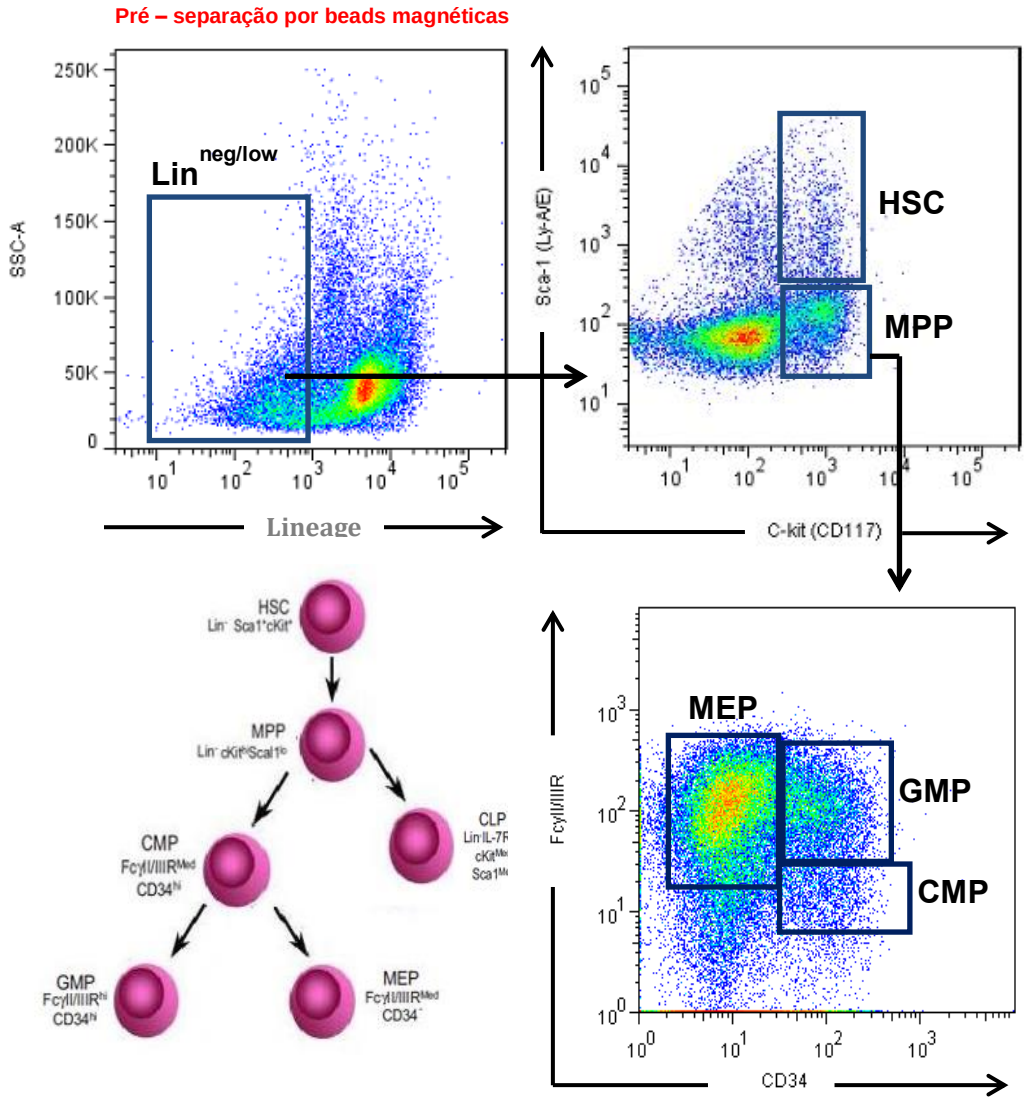
a população de células imunes na MO e no sangue periférico. Este fenômeno é outra característica essencial para o estabelecimento da mielopoese emergencial (BALDRIGDE et al., 2011). De acordo com os nossos resultados, apenas os animais AIRmax expandiram as populações de HSPC em resposta ao Biogel P-100®.

Os resultados obtidos indicam uma associação do fenótipo de alta capacidade inflamatória aguda da linhagem AIRmax com os mecanismos celulares de: 1) expansão de células progenitoras mielóides , 2) produção de granulócitos na MO; 3) mobilização de neutrófilos e granulócitos indiferenciados para o sangue periférico e 4) indução da produção local de fatores de crescimento mielóide, citocinas inflamatórias e quimicionas.

A regulação do sistema hematopoético envolve tanto propriedades intrínsecas como extrínsecas ao longo de todo o processo de desenvolvimento celular. Os fatores estimuladores de crescimento, produzidos na resposta inflamatória, alcançam o compartimento de HSPC na MO por meio da circulação sistêmica ,e assim, exercem suas funções sobre estas células pela sinalização mediada pela ligação destes fatores aos seus receptores específicos sobre as células hematopoéticas (BALDRIGDE et al., 2011).

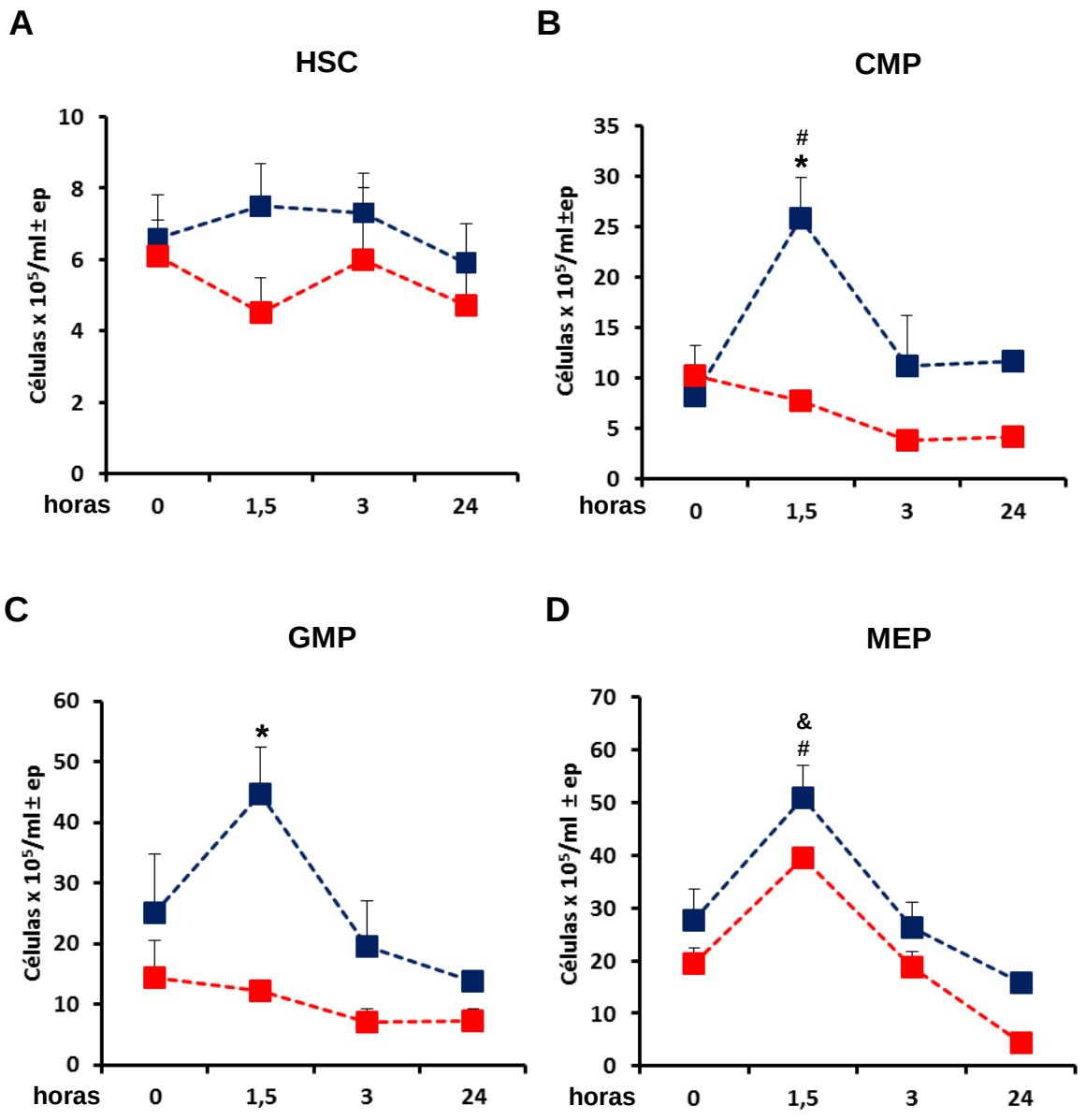
Após a constatação dos fenótipos observados nos animais AIRmax, buscamos entender os mecanismos determinantes da resposta aumentada e/ou acelerada das células da MO destes animais ao estímulo com Biogel P-100®. Desse modo, consideramos relevante avaliar, comparativamente entre AIRmax e AIRmin, a expressão gênica e protéica dos receptores de citocinas mielóides.

Figura 17- Representação da caracterização de células progenitoras mielóides na medula óssea



Citogramas representativo da populações de progenitores da medula óssea evidenciada pela marcação Sca1/Ckit/FcγRII/CD34**. HSC –** Hematopoietic Stem Cell; **MPP** – Multipotent Progenitor; **CMP** – Common Myeloid Progenitor; **MEP** – Megacaryocyte – Erytrocyte Progenitor; **GMP** – Granulocyte - Macrophage Progenitor. Árvore da hierarquia da diferenciação dos progenitores mielóides retirada de Renstrom et al., 2010.

Figura 18 - Caracterização das células progenitoras mielóides na medula óssea



Número absoluto de (**A**) – HSCs**; (B) –** CMPs; **(C) –** GMPs e **(D)** - MEPs na medula óssea nos grupos basais (n=6), 1h30 min (n=6), 3 h (n=6) e 24 h (n=6) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com BiogelP-100® e (&) AIRmin basal e tratados com Biogel P-100®. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

Tabela 4 – Porcentagem das populações de HSPCs na medula óssea durante a resposta inflamatória aguda

Grupos	HSC		CMP		GMP		MEP	
	AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin	AIRmax	AIRmin
Basal	2,4 ± 0,4	3,3 ± 0,6	3,1 ± 0,7	4,8 ± 1,3	8,1 ± 2,8	6,7 ± 2,2	10,3 ± 2,2	10,5 ± 2,0
Biogel 1,5h	1,7 ± 0,2	3,0 ± 0,3	5,9 ± 0,7	5,3 ± 0,9	10,2 ± 1,6	8,0 ± 0,7	12,1 ± 1,7	26,8 ± 6,9
Biogel 3h	2,1 ± 0,3	3,6 ± 0,6	3,4 ± 1,6	2,7 ±1,0	5,8 ± 2,2	4,9 ± 1,4	7,3 ± 0,8	11,7 ± 0,8
Biogel 24h	3,3 ± 0,5	4,6 ± 0,9	7,0 ± 0,7	4,0 ± 0,9	8,1 ± 0,4	8,1 ± 1,9	9,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5

Valores médios ± erro padrão de 6 animais por grupo.
(*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin
(#) Indica diferença significativa entre AIRmax basal e AIRmax tratado com Biogel P-100®
(&) Indica diferença significativa entre AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P-100®. $p<0,05$
Resultados de 2 experimentos independentes

4.9 Avaliação da cadeia β do receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 e da cadeia α do receptor de IL-3 nas HSPCs na resposta inflamatória aguda

Os fatores estimuladores de crescimento tais como o G-CSF, GM-CSF, M-CSF e IL-3 são reguladores essenciais do processo de mielopoese. Por meio da sinalização mediada pelos seus receptores específicos, estes fatores de crescimento modulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos progenitores e células mielóides na MO, podendo ainda instruir o comprometimento para uma linhagem celular específica. Porém, ocorre uma heterogeneidade quanto à porcentagem das HSPCs expressando receptores para os fatores solúveis, assim como quanto ao número de receptores expressos por célula. Além disso, os padrões de expressão destes receptores podem ser alterados em consequência de um estímulo inflamatório (KONDO et al., 2000; METCALF, 2008; McKINSTRY et al., 1997; revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012).

Neste contexto, a análise por citometria de fluxo nos permitiu avaliar a porcentagem, níveis de expressão por células e o número de células totais da MO expressando a cadeia β comum (CD131) dos receptores de GM-CSF/IL-3/IL-5 e a cadeia α do receptor de IL-3 (CD123) nas células Lin negativas da obtidas por separação imunomagnética (**Material e Métodos**). Na **Figura 19A** está representado o citograma de células da MO destacando a dupla marcação com os anticorpos dirigidos às moléculas CD131 e CD123. Não observamos diferenças significativas quanto à porcentagem de HSPCs expressando a GM-CSFRβ entre os animais AIRmax e AIRmin basais. Todavia, uma diferença interlinhagem foi observada no período de 3 h da indução da AIR em consequência de uma queda significativa da porcentagem destas células nos animais AIRmin. Para a expressão de IL-3R nenhuma diferença significativa inter ou intralinhagem, na porcentagem de células expressando este receptor foi observada (**Tabela 5).**

A seguir verificamos que, apenas nos animais AIRmax, houve um aumento significativo do número de células expressando a GM-CSFRβ (6,4 ± 0,7 x 10^6/mL) bem como a IL-3R (32,7 ± 4,4 x 10^6/mL) no período de 1h30 min da indução da AIR pelo Biogel P-100® em relação aos animais AIRmax basais (3,0 ± 0,5 x 10^6/mL e 17,6 ± 1,2 x 10^6/mL, respectivamente). Em consequência deste aumento, observamos também no período de 1h30 min da inflamação, uma diferença

significativa interlinhagem tanto para GM-CSFRβ quanto para IL-3R. Após 3h, verificamos uma diferença significativa interlinhagem quanto ao número de células expressando IL-3R (**Figuras 19A** e **19C**).

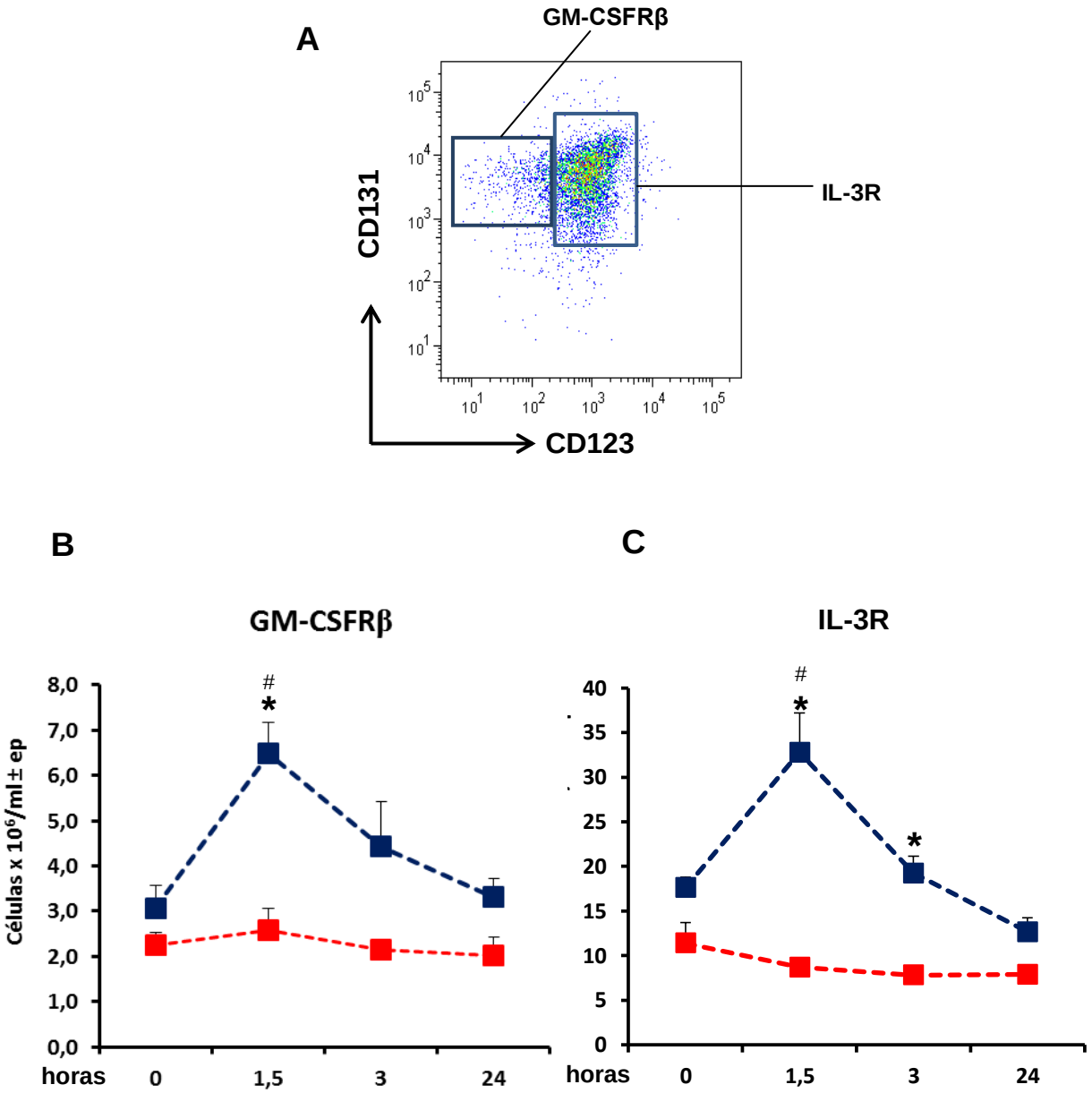
A análise dos níveis de expressão da molécula CD123 (IL-3Rα) não apresentou diferenças entre as linhagens AIRmax e AIRmin nos animais basais tampouco em resposta ao tratamento com Biogel P-100® (**Figura 21**). Entretanto, para a molécula CD131(GM-CSFRβ) evidenciamos uma população com baixa e outra com alta expressão desta em ambas as linhagens em condições basais. Curiosamente, após 1h30 min da indução da AIR, observamos que os animais AIRmax apresentam uma distinta população com baixa expressão de CD131 sendo ainda presente no tempo de 3h (**Figura 20**).

Tabela 5: Porcentagem de células progenitoras (Lin negativas) $CD131^{+}CD123^{neg}$ e $CD131^{+}CD123^{+}$ da MO durante a resposta inflamatória aguda

Grupos	**$CD131^{+}CD123^{neg}$ [GM-CSFRβ]**		**$CD131^{+}CD123^{+}$ [IL-3R]**	
	AIRmax	**AIRmin**	**AIRmax**	**AIRmin**
Basal	10,2 ± 1,0	11,8 ± 0,4	63,4 ± 5,9	57,2 ± 6,2
Biogel 1,5h	13,8 ±2,7	17,5 ± 3,3	66,9 ± 3,1	59,3 ± 1,5
Biogel 3h	13,9 ± 3,1	4,4 ± 1,0 &*	53,5 ± 2,3	55,7 ± 4,8
Biogel 24h	14,1 ± 1,0	12,6 ± 0,4	53,1 ± 1,4	51,9 ± 3,5

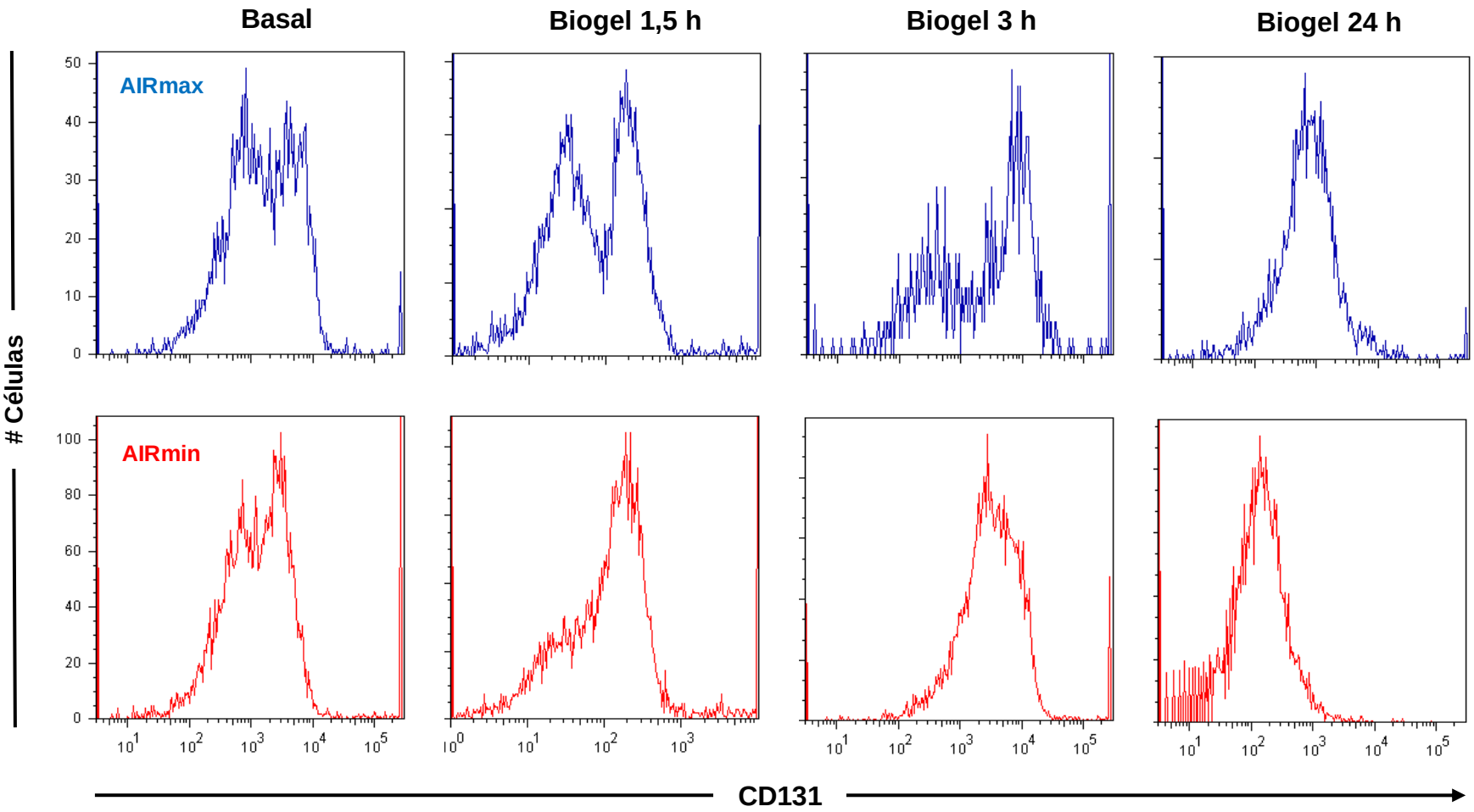
Valores médios ± erro padrão de 6 animais por grupo. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (&) entre AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P-100®. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

Figura 19 - Representação da caracterização de células progenitoras mielóides na medula óssea



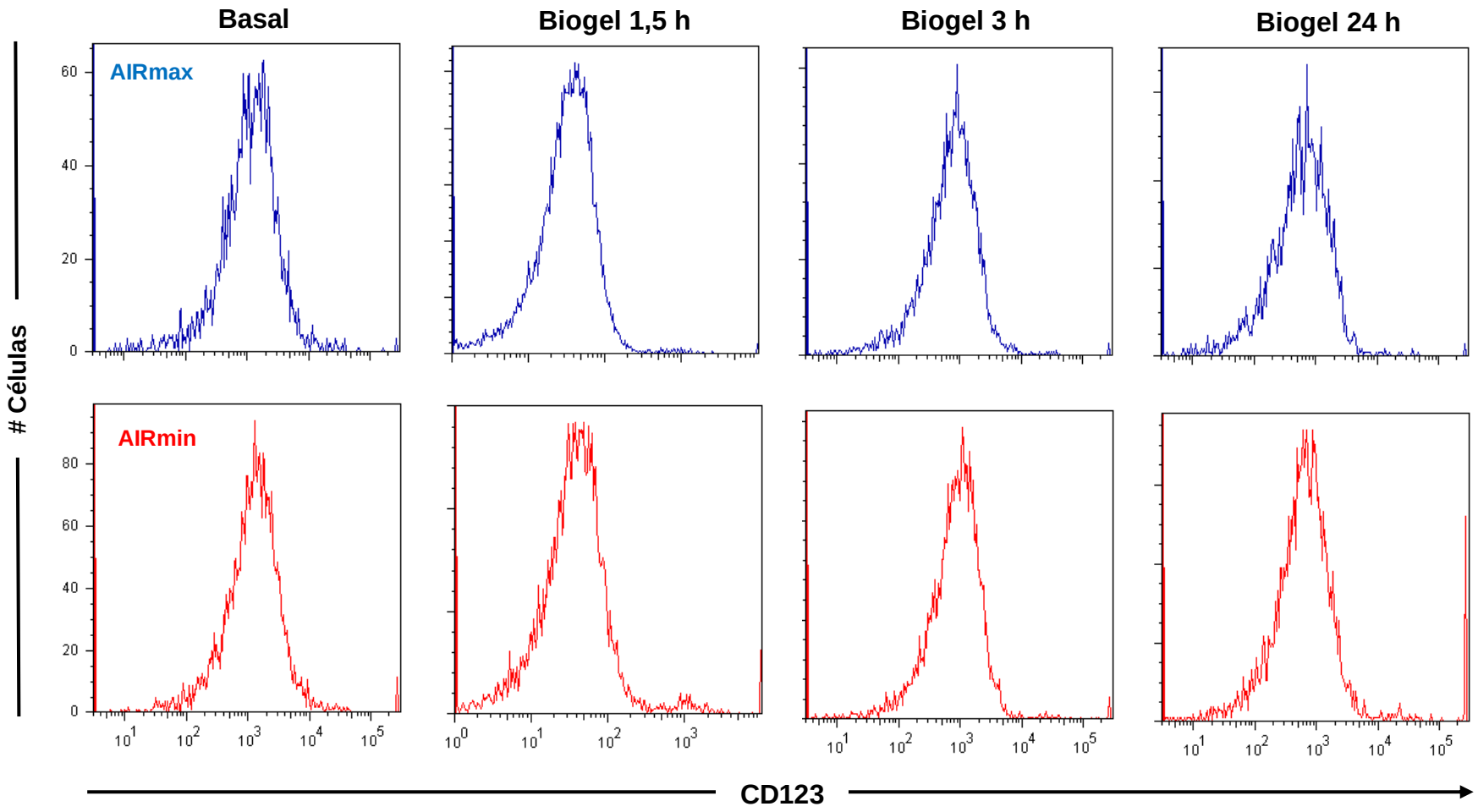
(A) - Citograma representativo da expressão da cadeia β comum do receptor de GM-CSF e da cadeia α específica do receptor de IL-3, evidenciada pela marcação CD131/CD123. **(B)** - Número absoluto de células expressando GM-CSFRβ e **(C)** – IL-3R na medula óssea nos grupos basais (n=6),1h30min (n=6), 3h (n=6) e 24h (n=6) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com BiogelP-100® e (&) AIRmin basal e tratados com Biogel P-100®. p<0,05. Resultados de 2 experimentos independentes.

Figura 20- Expressão da molécula CD131 nas células progenitoras (Lin negativas) da medula óssea



Histograma representativo da expressão da molécula CD131 (GM-CSFRβ) nas células progenitoras Lin negativas na medula óssea nos grupos basais, biogel 1,5 h, biogel 3 h e biogel 24 h após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax e AIRmin.

Figura 21 - Expressão da molécula CD123 nas células progenitoras (Lin negativas) da medula óssea



Histograma representativo da expressão da molécula CD123 (IL-3Rα) nas células progenitoras Lin negativas na medula óssea nos grupos basais, biogel 1,5 h, biogel 3 h e biogel 24 h após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax e AIRmin.

4.10 Expressão de genes reguladores da mielopoese nas HSPCs durante a resposta inflamatória aguda

4.10.1 Fatores estimuladores de crescimento

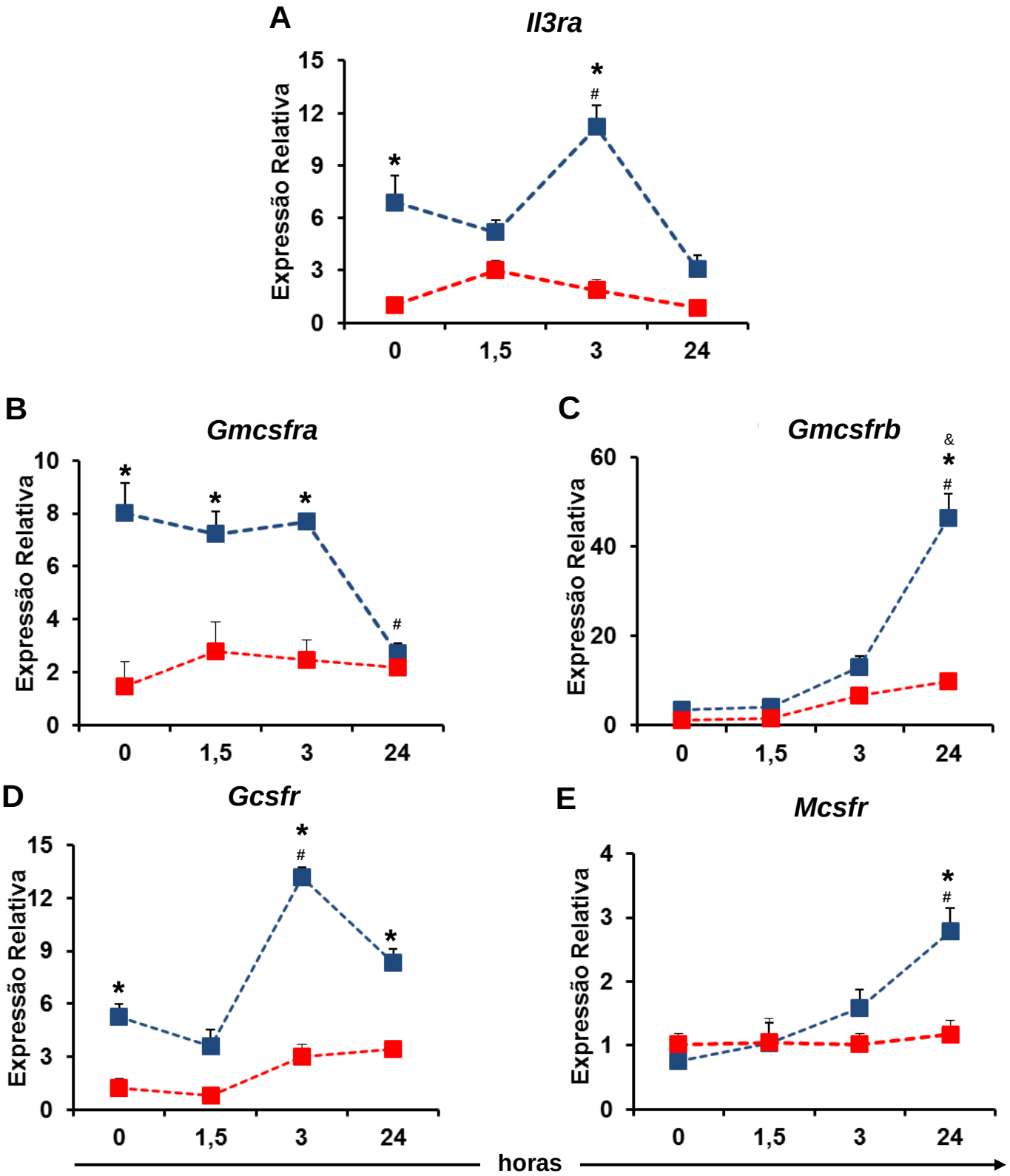
Adicionalmente à análise por citometria de fluxo da expressão dos receptores de GM-CSF e IL-3, verificamos o perfil de expressão gênica destes e doutros receptores de citocinas relacionados ao crescimento de células mielóides na MO.

Assim, a partir das células Lin negativas da medula óssea extraímos o RNA total destas nas condições basais e após 1h 30 min, 3 e 24 h após estímulo com Biogel P-100®. Sintetizamos o cDNA por meio da reação de transcriptase reversa e adicionamos os primers específicos para a amplificação da região de interesse do cDNA (**Materiais e Métodos**).

Na **figura 22** estão representados os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (expressão relativa) dos genes *Il3ra*, *Gmcsfra, Gmcsfrb, Gcsfr* e *Mcsfr*. Observamos que os níveis de expressão dos genes *Il3ra* (6,09±1,51), *Gmcsfra* (8,02±1,13) e *Gcsfr* (5,24±0,76) nos AIRmax basais são significativamente maiores à expressão destes genes nos animais AIRmin basais (1,04±0,2 2), (1,47±0,92) e (1,23±0,55), respectivamente. Após a indução da resposta inflamatória, os animais AIRmax mostraram maiores níveis de expressão gênica em relação aos animais ARmin para todos os genes avaliados (**Figura 22**).

Nos animais AIRmax, 3 h após a indução da resposta inflamatória observamos um aumento nos níveis de expressão dos genes *Il3ra* (11,2±1,23) e *Gcsfr* (13,2±0,54), em relação aos animais AIRmax basais, enquanto que no tempo de 24 h esta modulação só foi observada para a expressão dos genes *Gmcsfrb* (46,37±5,47) e *Mcsfr* (2,78±0,35). Nos animais AIRmin, no período de 24 h, observamos uma diferença significativa na expressão do gene GM-CSFRβ (9,69±1,35) em relação aos animais AIRmin basais (1,02±0,12) (**Figura 22**).

Figura 22 - Expressão de receptores de citocinas hematopoéticas nas células progenitoras da medula óssea



Expressão relativa dos genes **(A)** – IL-3Rα; **(B)** – GM-CSFRα; **(C)** - GM-CSFRβ; **(D)** – G-CSFR e **(E)** – M-CSFR nas populações de progenitores da medula óssea dos animais em condições basais (n=3), 1h 30 min (n=3), 3 h (n=3) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P-100®. p <0,05. Resultados de 1 experimento.

4.10.2 Fatores de transcrição

Os mecanismos moleculares que controlam o processo de mielopoese envolvem importantes reguladores transcricionais que induzem a expressão de genes específicos para uma determinada linhagem celular (FARSCHOU; BORREGAARD, 2003; SKALNIK, 2001). As citocinas por meio da sinalização mediada pelos seus modulam a expressão de fatores de transcrição em estágios específicos da mielopoese, determinando o comprometimento para um tipo celular específico e a resposta emergencial a uma condição de estresse. Desta forma, avaliamos a expressão gênica (expressão relativa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos fatores de transcrição C/EBPα, C/EBPβ e PU.1 críticos na mielopoese basal e emergencial, nas HSPCs da MO dos camundongos AIRmax e AIRmin.

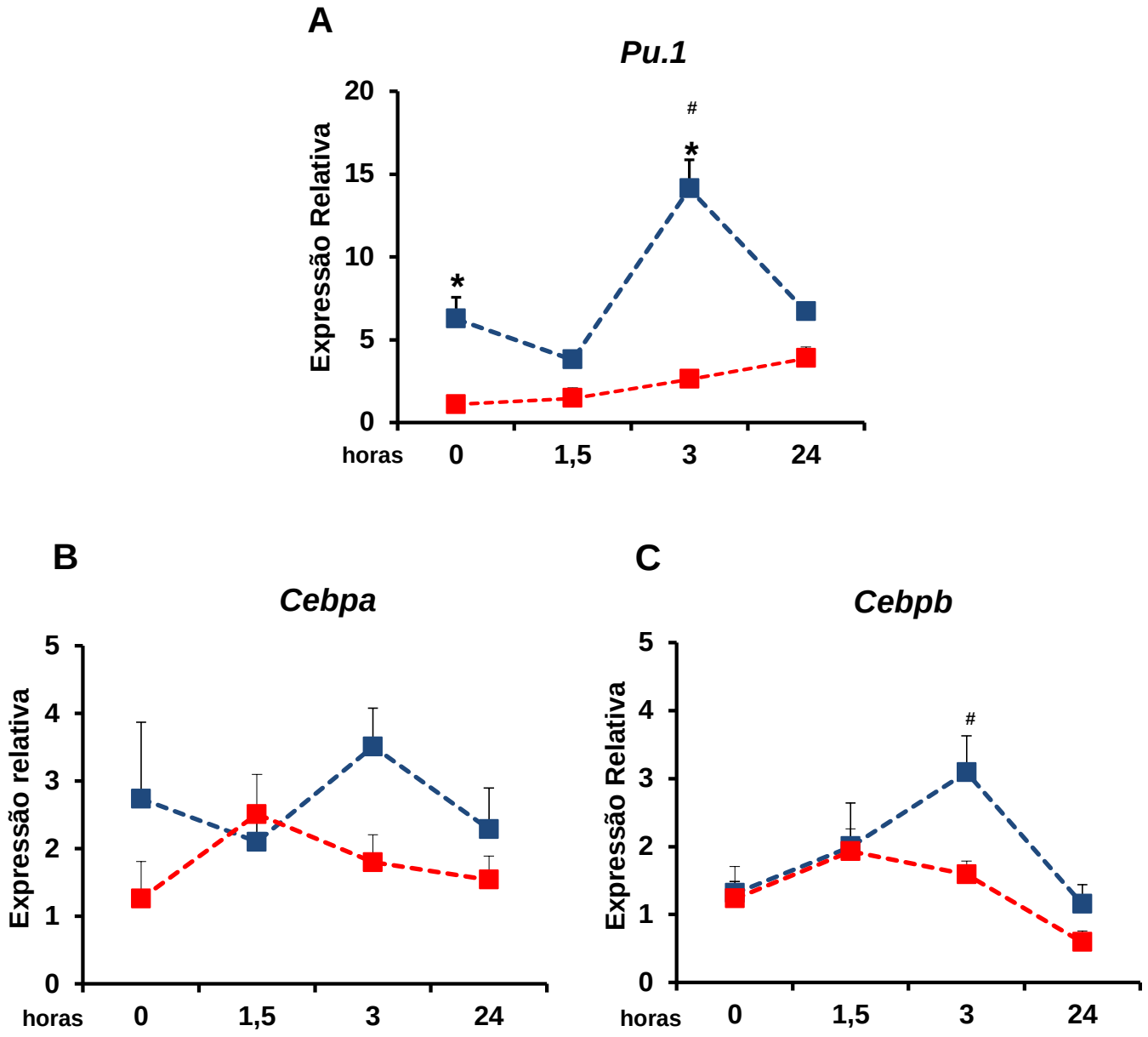
Inicialmente, observamos diferenças significativas entre as duas linhagens quanto ao nível de expressão do gene *Pu.1*, sendo maior nas células oriundas dos animais AIRmax (6,26±1,3) em condições basais do que naquelas dos animais AIRmin (1,09±0,29) também em condições basais. Esta diferença interlinhagem também foi observada no período de 3 h após a indução da inflamação pelo Biogel P-100®. Além disso, verificamos que apenas os animais AIRmax mostraram aumento no nível de expressão deste fator de transcrição em resposta ao estímulo inflamatório (14,12±1,75) quando comparado aos AIRmax basais (6,26±1,3) , no período de 3 h de Biogel P-100® (**Figura 23A**). O fator de transcrição PU.1 desempenha um papel essencial na progressão da diferenciação de células mielóides em resposta ao G-CSF, GM-CSF e M-CSF, o que demonstra a importância da expressão aumentada deste gene nas HSPCs dos animais AIRmax. Esta característica pode contribuir decisivamente para os fenótipos de maior produção de progenitores mielóides e de granulócitos indiferenciados (promielócitos e mielócitos) observado apenas nos animais AIRmax (**Figuras 14 e 18**).

O gene *Cebpa* é descrito como um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento da hematopoese basal, sendo responsável pela regulação de genes críticos para os passos iniciais e tardios da diferenciação mielocítica, além de ligar-se aos promotores destes genes e aumentarem a expressão de um grande número de genes específicos mielóides, incluindo os receptores de citocinas para M-CSF, G-CSF, GM-CSF além dos genes codificadores de proteínas dos grânulos de

neutrófilos como MPO e elastase (HIRAI et al., 2006; LECABEC et al., 1996; LECABEC et al., 1997). No nosso modelo, não observamos diferenças significativas de expressão de *Cebpa* entre as duas linhagens em condições basais ou mesmo após a indução da inflamação em nenhum dos períodos avaliados (**Figura 23B**).

Hirai et al., (2006) demonstraram não haver anormalidades em camundongos deficiente do gene *Cebpb* na hematopoese basal. Em contrapartida, a expressão deste gene é essencial para uma proliferação eficiente de progenitores de granulócitos em resposta a estímulos externos, tais como citocinas, inflamação e infecções (HIRAI et al., 2006). No nosso modelo, verificamos que em condições basais os animais AIRmax e AIRmin apresentaram níveis similares de expressão do *Cebpb*, com valores de (1,31±0,18) e (1,23±0,4), respectivamente. Porém, apenas os animais AIRmax aumentaram o nível desta expressão 3 h (3,09 ± 0,54) após o estímulo inflamatório retormando aos valores basais após 24 h de Biogel P-100® (**Figura 23C**).

Figura 23 - Expressão dos fatores de transcrição nas células progenitoras da medula óssea



Expressão relativa dos genes **(A)** - *Pu.1*, **(B)** - *Cebpa* e **(C)** - *Cebpb* nas populações de progenitores da medula óssea dos animais basais (n=3), 1h30 min (n=3), 3 h (n=3) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P-100®. $p < 0,05$. Resultados de 1 experimento.

4.11 Avaliação da cadeia β do receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 e da cadeia α do receptor de IL-3 nas células totais da MO na vigência da resposta inflamatória aguda

Após a análise e constatação dos fenótipos de expressão dos receptores nas HSPCs, avaliamos a expressão da cadeia β comum dos receptores de GM-CSF/IL-3/IL-5 (CD131) e a cadeia α do receptor de IL-3 (CD123) nas células totais da MO oriundas dos camundongos AIRmax e AIRmin. Na **Figura 24A** podemos observar o citograma representativo destas populações. Os resultados demonstraram que os animais ARmax em condições basais possuem uma porcentagem significativamente superior de células da MO expressando o GM-CSFRβ (30,4 ± 2,1%) e o IL-3R (49,7 ± 3,8%) do que os animais AIRmin, que mostraram valores de 16,7 ± 2,4% para GM-CSFRβ e 35,6 ± 0,6% para o IL-3R. Diferenças significativas interlinhagem na porcentagem de células expressando IL-3R também foram observadas após 1h 30 min e 24 h da indução da inflamação pelo Biogel P-100®. Em contrapartida, nos animais AIRmax, a porcentagem de células expressando GM-CSFRβ após 24 h (16,7 ± 0,8%) do estímulo inflamatório apresentou uma queda significativa em relação aos AIRmax basais (30,4 ± 2,1%) (**Tabela 6**). Estes resultados sugerem que os animais AIRmax apresentam constitutivamente maior capacidade de proliferação, diferenciação e sobrevivência das células mielóides responsivas ao GM-CSF e IL-3.

Além disso, exceto para o período de 24h da injeção s.c de Biogel P-100®, todos os tempos de inflamação avaliados mostraram diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin quanto ao número total de células da MO expressando os receptores GM-CSFRβ e IL-3R. Observamos também que às 24 h, ocorreu uma queda significativa no número de células dos animais AIRmax expressando GM-CSFRβ (0,94 ± 0,3 x 10^6/mL) e IL-3R (3,34 ± 1,0 x 10^6/mL), em relação aos animais AIRmax basais expressando GM-CSFRβ (8,0 ±1,4 x 10^6/mL) e IL-3R (13,2 ± 2,5 x 10^6/mL) (**Figura 24B e 24C**).

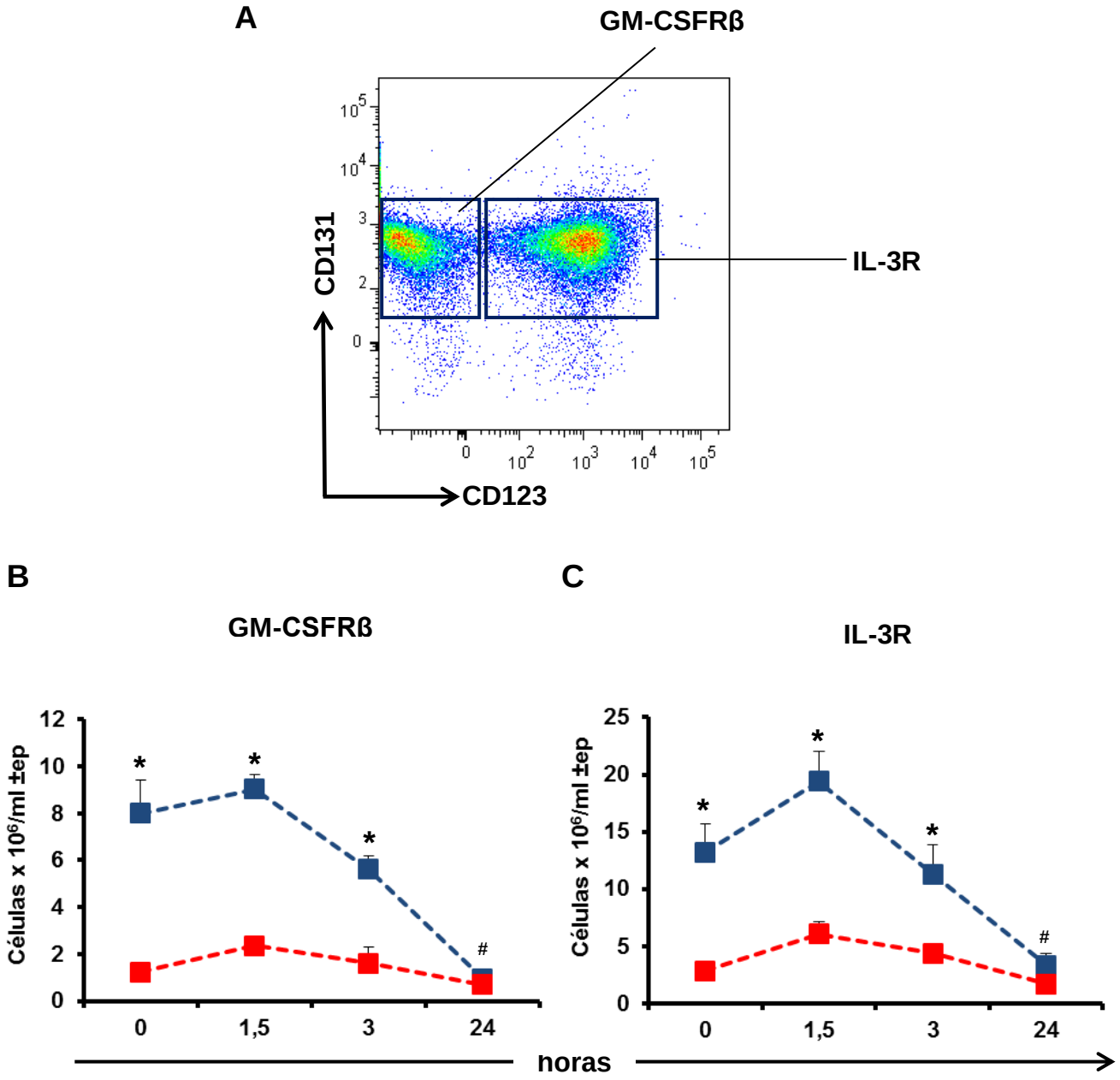
A análise da intensidade de expressão de CD131 e CD123 por células não mostrou diferenças entre AIRmax e AIRmin em nenhum dos períodos estudados (ALBUQUERQUE; RIBEIRO, Resultados não publicados).

Tabela 6 - Porcentagem de células da MO $CD131^{+}CD123^{neg}$ e $CD131^{+}CD123^{+}$ durante a resposta inflamatória aguda.

Grupos	$CD131^{+}CD123^{neg}$ [GM-CSFRβ]		$CD131^{+}CD123^{+}$ [IL-3R]	
	AIRmax	**AIRmin**	**AIRmax**	**AIRmin**
Basal	30,4 ± 2,1*	16,7 ± 2,4	49,7 ± 3,8*	35,6 ± 0,6
Biogel 1,5h	26,3 ± 3,1	15,9 ± 2,7	53,7 ± 1,4*	38,2 ± 2,9
Biogel 3h	27,0 ± 1,5	18,2 ± 3,9 &*	54,13 ± 2,7	43,7 ± 2,8
Biogel 24h	16,7 ± 0,8#	15,8 ± 1,0	59,0 ± 4,0*	39,9 ± 2,4

Valores médios ± erro padrão de 4 animais por grupo. (*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (&) entre AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P-100®. $p<0,05$. Resultados de 2 experimentos independentes.

Figura 24 - Expressão dos receptores de superfície celular GM-CSFRβ e IL-3R



(A)- Citograma representativo da expressão da cadeia β comum do receptor de GM-CSF e da cadeia α específica do receptor de IL-3, evidenciada pela marcação CD131/CD123. **(B)** - Número absoluto de células expressando GM-CSFRβ e (**C) -** IL-3R na medula óssea nos grupos basais (n=4), 1 h 30 min (n=4), 3 h (n=4) e 24 h (n=3) após a injeção s.c de de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P-100. p <0,05. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.12 Expressão gênica de fatores de transcrição e da molécula DPP4 nas células da medula óssea na vigência da resposta inflamatória aguda

Após a análise da expressão gênica dos fatores de transcrição *Cebpa* e *Cebpb* nas células progenitoras da MO, avaliamos a expressão destes dois genes e o gene codificador da enzima dipeptidilpeptidase 4 (DPP4) nas células totais da MO ao longo da cinética resposta inflamatória aguda. A enzima DPP4, também denominada CD26, age como um regulador negativo da atividade dos fatores estimuladores de colônias, dentre eles: G-CSF, GM-CSF e IL-3. Esta molécula é expressa nas células – tronco e progenitoras hematopoéticas como um receptor de superfície ou na forma solúvel. A DPP4 diminui a atividade dos CSFs pela clivagem da porção N-terminal dos CSFs, gerando uma proteína truncada com afinidade pelo receptor 8 vezes superior aos CSFs não – truncados. Todavia, esta ligação ao receptor não é capaz de desencadear uma sinalização celular eficiente para induzir a expansão e sobrevivência das HSPCs (Revisado em: BROXMEYER et al., 2012).

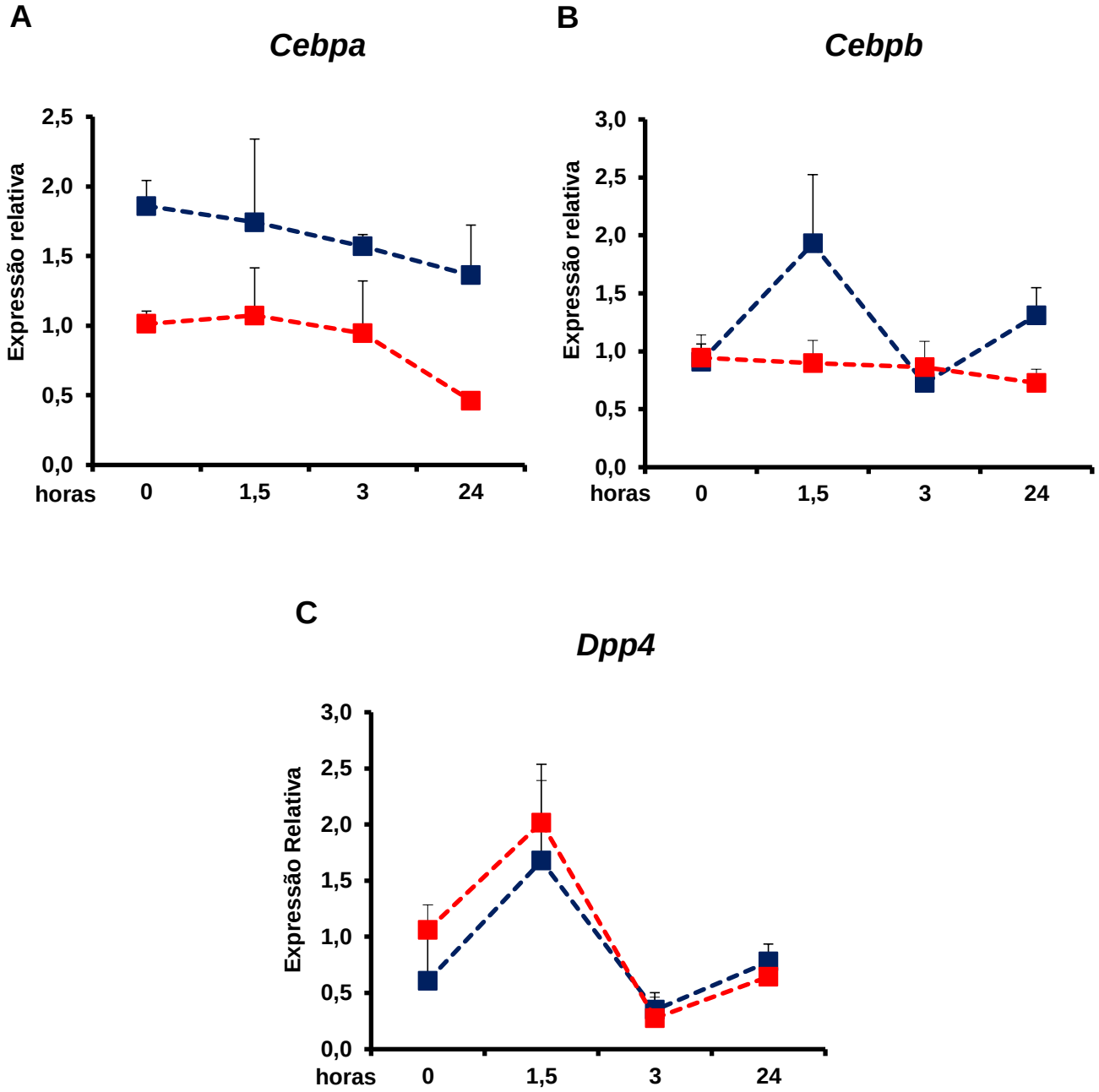
A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos inferir que os animais AIRmin não foram capazes de desenvolver uma mielopoese emergencial em resposta ao estímulo inflamatório com o Biogel P-100®. Esta característica foi corroborada pelos outros fenótipos de ausência de: *1*) neutrofilia reativa; *2*) presença de neutrófilos imaturos na circulação; *3*) expansão de células progenitores mielóides e granulócitos na MO e 4) aumento dos níveis de PU.1 e C/EBPβ em resposta ao Biogel P-100®. Assim, avaliamos a expressão do gene *Dpp4* nas células totais da MO como um mecanismo de regulação negativa da mielopoese possivelmente presente nos animais AIRmin.

Nossos resultados não demonstraram alterações significativas do gene *Dpp4* entre os animais AIRmax e AIRmin basais e, no mesmo sentido, para todos os períodos avaliados após a indução da AIR (**Figura 25C**).

Semelhantemente ao perfil de expressão observado nas HSPCs, os gene *Cebpa* não apresentou diferenças significativas inter e intralinhagem em nenhum dos períodos avaliados (**Figura 25A).**

Quanto à expressão do gene *Cebpb* observamos, apenas nos animais AIRmax, um evidente aumento dos níveis no período de 1h30 min da indução da AIR em relação aos animais AIRmax basais (**Figura 25B)**.

Figura 25 - Expressão gênica nas células totais da medula óssea



Expressão relativa dos genes **(A)** - *Cebpa*, **(B)** - *Cebpb* e **(C)** - *Dpp4* nas células totais da medula óssea dos animais basais (n=7), 1 h 30 min (n=5), 3 h (n=6) e 24 h (n=7) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Os valores estão expressos como média ± erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Resultados de 2 experimentos independentes.

4.13 Resposta proliferativa in vitro das células da medula óssea em resposta a diferentes fatores de crescimento associados ou não ao ácido retinóico

4.13.1 Ensaio clonogênico

A expressão diferencial, entre AIRmax e AIRmin, dos fatores de transcrição e ainda, o maior número de células expressando receptores de citocinas hematopoéticas nos animais AIRmax, podem atuar como mecanismos críticos na resposta das HSPCs aos CSFs e assim determinar o potencial proliferativo e de diferenciação em granulócitos maduros na vigência da resposta inflamatória. Para testar esta hipótese, realizamos experimentos de cultura de clonal *in vitro* a fim de avaliar a capacidade proliferativa dos precursores hematopoéticos capazes de gerar unidades formadoras de colônias (CFU – [Do inglês: colony-stimulating factor]) granulócitos-macrófagos.

Após perfusão dos fêmures, as células da MO foram cultivadas na concentração de $5x10^4$ células/mL na presença da combinação das citocinas G-CSF + GM-CSF + IL-3 em meio de metilcelulose. Após 7 dias de cultura a 37 °C 5% de tensão de CO_2, as colônias que continham mais de 50 células foram contadas e avaliadas quanto ao tipo GM-CFU (unidade formadora de colônias granulócitos-macrófagos) e M-CFU (unidade formadora de colônias macrófagos).

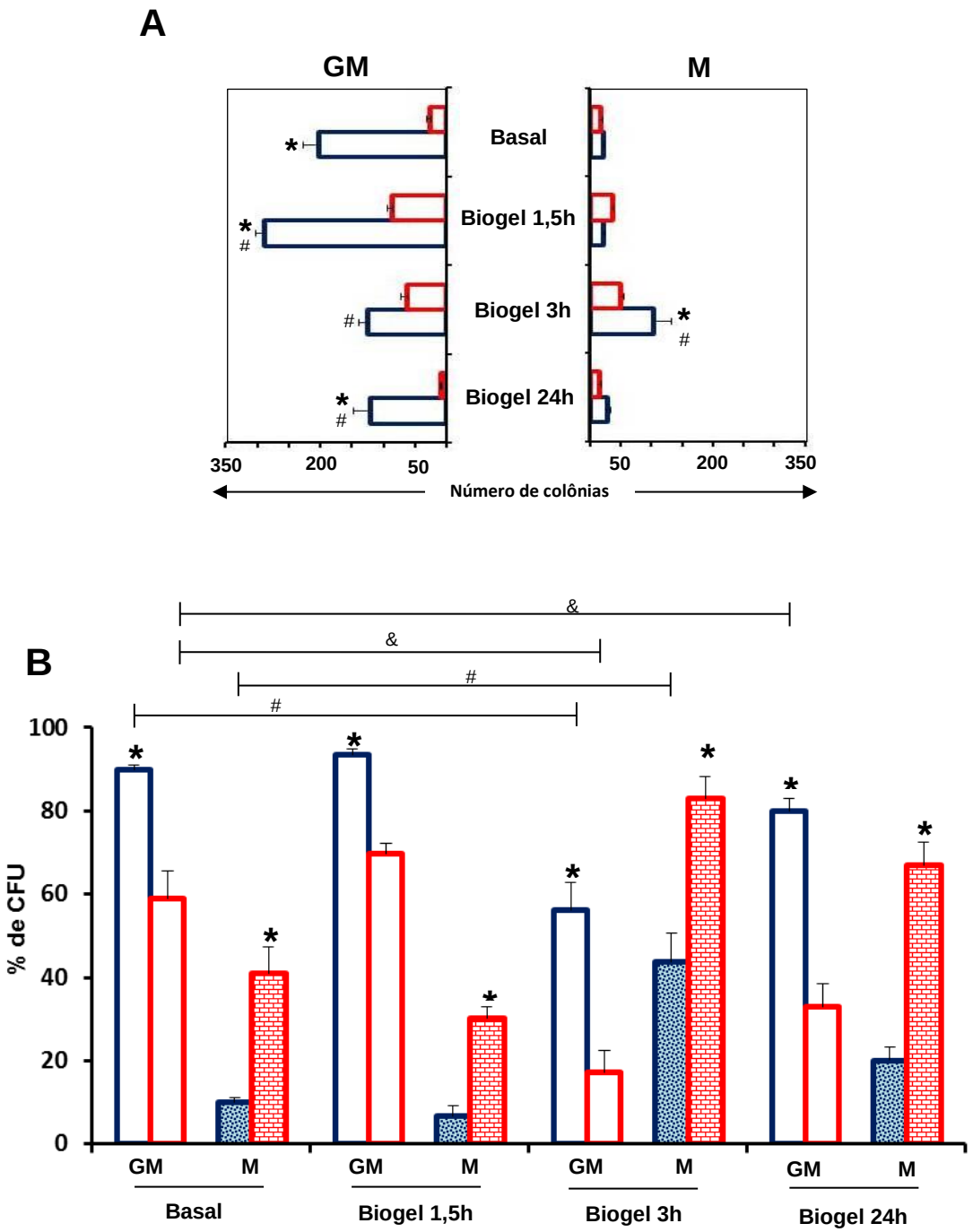
Na **Figura 26A** representamos o número total de GM-CFU e M-CFU. Observamos já nos animais basais, uma diferença interlinhagem significativa a favor dos animais AIRmax representando um total 8 vezes superior (203,3 ± 24,0 colônias) quanto ao número médio de GM-CFU em comparação aos animais AIRmin (25,3 ± 4,9 colônias). Esta diferença interlinhagem foi também verificada após os períodos de 1 h 30 min e 24 h da indução da inflamação. Em adição, o aumento da capacidade de expansão das células progenitoras em resposta ao estímulo pelo Biogel P-100® foi constatada nos animais AIRmax considerando o aumento significativo do número de GM-CFU após 1 h 30 min (289,5 ± 13,9 colônias) da inflamação em relação aos animais AIRmax basais. Por outro lado, os tempos seguintes de avaliação da AIR demonstraram queda significativa destas colônias em relação aos animais basais.

Contrário ao resultado observado para o número total de GM-CFU, não observamos diferença interlinhagem significativa na formação de M-CFU nos grupos de animais basais, sendo esta diferença observada apenas após 3h da indução da AIR. Além disso, neste mesmo período verificamos que os animais AIRmax apresentaram um aumento significativo (104,7 ± 27,7 colônias) em relação aos animais AIRmax basais (21,7 ± 1,6 colônias) (**Figura 26A**).

De modo geral, nossos resultados indicam que a ação sinérgica dos fatores G-CSF, GM-CSF e IL-3 estimulou o comprometimento das células progenitoras da MO para a linhagem mielogranulocítica nos animais AIRmax e monomacrofágica nos animais AIRmin. Estes dados podem ser verificados quando avaliamos as proporções de GM-CFU e M-CFU comparativamente entreas duas linhagens. Desta forma, constatamos proporções significativamente maiores de GM-CFU nos animais AIRmax ao passo que os animais AIRmin mostraram maior frequência de colônias do tipo M-CFU (**Figura 26B**).

É importante ressaltar que, ao longo de toda a cinética, as células oriundas dos animais AIRmax formaram colônias maiores do que os animais AIRmin, ou seja, maior número de células por colônias, indicando uma capacidade proliferativa maior dos camundongos AIRmax. De fato, os experimentos subsequentes de cultura líquida demonstraram esta característica da linhagem.

Figura 26 - Ensaio clonogênico das células totais da MO



(A) - Número total de unidades formadores de colônias (CFU) e **(B)** – porcentagem de colônias de granulócitos (GM-CFU) e macrófagos (M-CFU) após 7 de cultura à 37°C 5% CO_2 a partir das células totais da medula óssea dos animais basais (n=4), 1 h 30 min (n=4), 3 h (n=4) e 24 h (n=4) após a injeção s.c de Biogel P-100® no dorso dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). As culturas foram realizadas em metilcelulose suplementada com G-CSF + GM-CSF + IL-3. As amostras foram cultivadas em duplicata e os valores estão expressos como média das ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin, (#) AIRmax basal e tratados com Biogel P-100®, (&) AIRmin basal e tratados com tratados com Biogel P-100® . p <0,05. Resultados de 1 experimento.

A seguir, realizamos experimentos de cultura líquida das células das MO para avaliar a capacidade proliferativa destas células, comparativamente em AIRmax e AIRmin, bem como estabelecer uma condição *in vitro* que mimetize as diferenças significativas entre as duas linhagens observadas nas avaliações *ex vivo* no que concerne a: celularidade da MO, maior produção de neutrófilos segmentados e maior número de células expressando receptores de citocinas.

Utilizando o mesmo protocolo dos experimentos anteriores, $5x10^5$ células/mLforam cultivadas na presença de diversas combinações de citocinas hematopoéticas associadas ou não ao ácido retinóico ATRA (Do inglês: All Trans Retinoic Acid). A ação sinérgica dos CSFs e ATRA favorece a proliferação e diferenciação celular, induzindo principalmente a maturação neutrofílica (BERLINER, 1998).

Desta forma, utilizamos seis citocinas, a saber: G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-6 e SCF e o ácido retinóico (ATRA). Após 5 dias de cultura à 37 °C e tensão de 5% de CO_2, as suspensões foram avaliadas quanto ao número total de células e os resultados expressos como a média do número de células/mL (**Tabela 7**).

Verificamos neste experimento que as células cultivadas somente com o meio de cultura e somente com o ATRA, apresentaram baixo nível de proliferação e de maneira equivalente em AIRmax e AIRmin. Por outro lado, a adição de uma única citocina foi suficiente para induzir proliferação das células da MO de ambas as linhagens. Entretanto, as células dos animais AIRmax mostraram-se mais responsivas aos estímulos com G-CSF, GM-CSF, IL-3 e SCF do que as oriundas dos animais AIRmin.

Nestes experimentos pudemos verificar que dentre as 38 combinações de fatores de crescimento utilizados, 21 estimularam diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin no perfil das culturas, onde os animais AIRmax apresentaram maior capacidade proliferativa a estes estímulos. Importante ressaltar que todos os estímulos com a presença de IL-3 mostraram diferenças significativas interlinhagem.

Por outro lado, duas combinações, GM+SCF+A e GM+G+A, mostraram maior número de células nos animais AIRmin, no entanto não foram significativamente diferente dos animais AIRmax (**Tabela 7**).

Na **Figura 27** estão representadas as combinações de citocinas que mostraram as maiores diferenças no nível de proliferação das células da MO dos

animais AIRmax comparado aos animais AIRmin. Observamos que o estímulo com GM e GM+ATRA induziu aproximadamente o dobro de proliferação nos animais AIRmax. As combinações IL-3+SCF+ATRA, G-CSF+IL-3 e G-CSF+IL-3+ATRA promoveram as maiores diferenças, alcançando níveis de 5,2 vezes superiores. Sendo assim, acreditamos que esta última condição seja a que mais mimetize o fenótipo observado *in vivo* nos animais AIRmax.

Objetivando uma interpretação mais geral do processo de proliferação e diferenciação *in vitro* operante nas células da MO destes animais, realizamos uma cinética de proliferação. As células da MO foram cultivadas na concentração de $5x10^5$ células/mL e estimuladas com IL-3; IL-3+SCF+ATRA e G-CSF+IL-3+ATRA e as culturas avaliadas após 1, 3 e 5 dias. Observamos que o estímulo com IL-3 sozinho estimulou maior proliferação nas células dos animais AIRmax com diferença significativa aos 5 dias de cultura (**Figura 28A**). O mesmo fenômeno foi observado nas células estimuladas com IL-3+SCF+ATRA (**Figura 28B).** As citocinas hematopoéticas além de estimularem a proliferação e diferenciação, mantêm a sobrevivência das células hematopoéticas. No entanto, as células completamente diferenciadas, principalmente os neutrófilos, entram em apoptose espontânea em aproximadamente 24 h de cultura (DIDICHENKO et al., 2008). Estes estímulos apesar de apresentarem uma diferença significativa entre as duas linhagens, não estimularam uma alta resposta proliferativa, visto que o número de células totais aos 5 dias de cultura nos animais com alta resposta a estes fatores (AIRmax) foi menor do que as células cultivadas no dia 0 ($5x10^5$ células/mL).

Na **Figura 28C** observamos que o estímulo com G-CSF+IL-3+ATRA foi capaz de induzir uma alta proliferação das células dos animais AIRmax, mostrando diferença significativa entre AIRmax e AIRmin aos 5 dias de cultura. O estímulo com G-CSF+IL-3+ATRA apresentou um perfil proliferativo mais semelhante ao fenótipo que observamos *ex vivo*. Desta forma, caracterizamos nesta condição, após 5 dias de cultura, as populações de granulócitos e a expressão dos receptores GM-CSFRβ e IL-3R por citometria de fluxo.

Assim, por meio das marcações com anticorpos específicos (**materiais e métodos**) foi possível diferenciar as populações de granulócitos totais ($CD11b^+GR1^+$) e maduros ($CD38^{neg}GR1^+$) em maior número nas culturas de células da MO de AIRmax do que dos animais AIRmin (**Figuras 29A e 29B**).

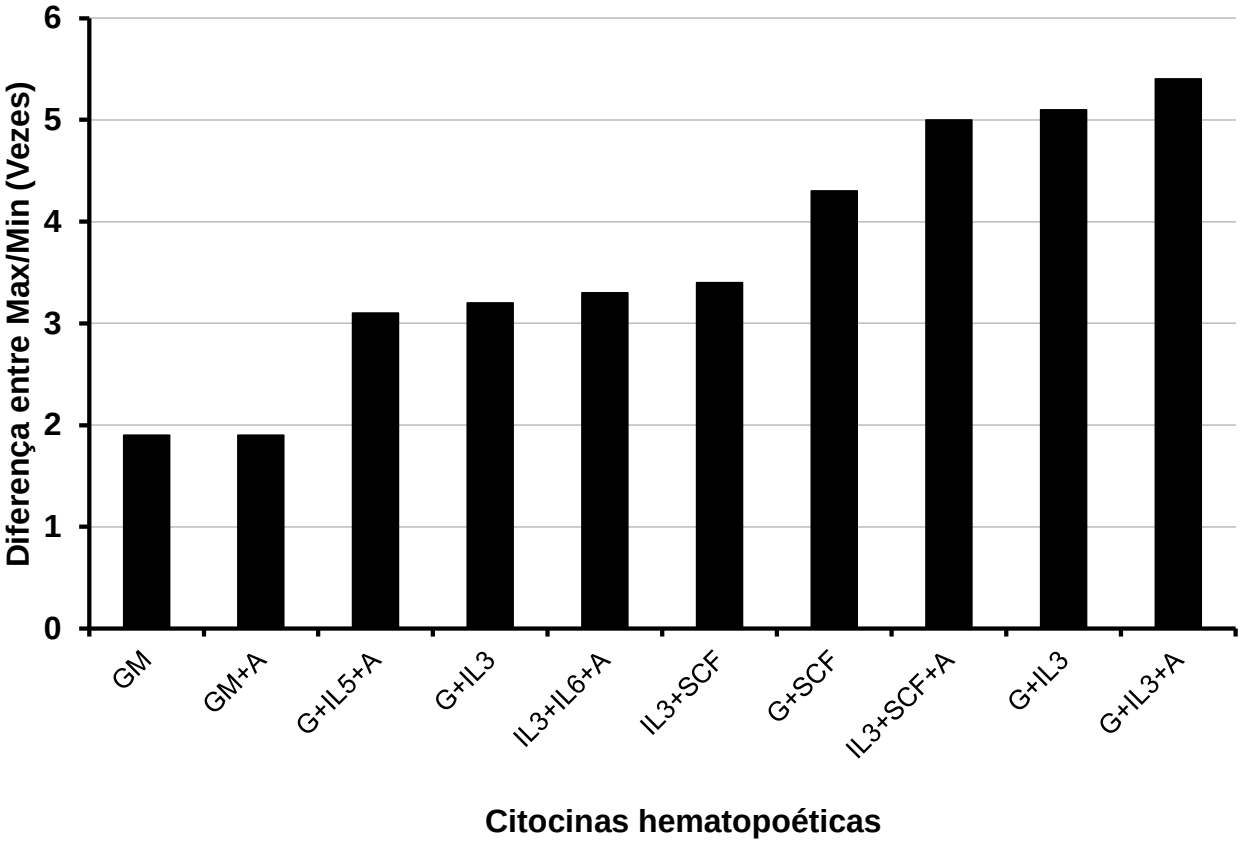
O número de células expressando a cadeia β comum dos receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5 (CD131) e cadeia α do receptor de IL-3 foi representado nas **figuras 29C** e **29D,** respectivamente. Condizente com os resultados observados de expressão destes receptores *ex vivo* (**Figuras 19 e 24**), verificamos diferenças significativas interlinhagem a favor dos animais AIRmax no número de células expressando o GM-CSFRβ e IL-3R. Portanto, sugerimos que as condições de cultivo celular pelo período de 5 dias com G-CSF+IL-3+ATRA, por apresentarem fenótipos celulares semelhantes aos observados *ex vivo*, mostraram-se como condições favoráveis para o estudo comparativo da mielopoese *in vitro* nestas duas linhagens.

Tabela 7 - Proliferação das células da medula óssea em resposta a diferentes combinações de fatores de crescimento

Estímulo	Células x 10^5/mL ± ep		N	(*)	Estímulo (SCF+ATRA)	Células x 10^5/mL ± ep		N	(*)
	AIRmax	AIRmin				AIRmax	AIRmin		
Sem	0,66 ± 0,22	0,19 ± 0,04	6	não	ATRA	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	4	não
G	2,14 ± 0,13	0,98 ± 0,24	4	sim	G+A	1,13 ± 0,30	0,35 ± 0,13	4	sim
G+SCF	0,78 ± 0,12	0,18 ± 0,04	4	sim	G+SF+A	0,50 ± 0,03	0,28 ± 0,11	4	sim
GM	11,58 ± 1,84	5,99 ± 1,24	12	sim	GM+A	11,24 ± 1,66	5,85 ± 1,51	12	sim
GM+SCF	5,58 ± 0,23	4,36 ± 0,56	4	não	GM+SCF+A	8,94 ± 1,82	11,05 ± 1,42	4	não
GM+G	9,28 ± 1,02	7,50 ± 1,29	6	não	GM+G+A	8,13 ± 0,96	11,53 ± 1,76	6	não
IL-3	2,60 ± 0,56	0,65 ± 0,15	8	sim	SCF	2,09 ± 0,19	1,05 ± 0,14	4	sim
IL-3+SCF	4,85 ± 0,56	1,41 ± 0,17	6	sim	IL-3+SCF+A	3,53 ± 0,52	0,70 ± 0,07	10	sim
G+IL-3	5,68 ± 0,69	1,10 ± 0,27	8	sim	G+IL-3+A	9,90 ± 1,40	1,87 ± 0,39	20	sim
GM+IL-3	10,89 ± 0,31	8,55 ± 0,43	4	sim	GM+IL-3+A	10,29 ± 1,10	6,0 ± 0,34	4	sim
IL-5	0,64 ± 0,06	0,45 ± 0,01	4	não	IL-6	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,03	4	não
IL-3+IL-5	6,12 ± 0,61	3,14 ± 0,86	4	sim	IL-3+IL-5+A	3,53 ± 0,11	1,98 ± 0,43	4	sim
IL-3+IL-6	4,93 ± 0,31	3,09 ± 0,74	4	não	IL-3+IL-6+A	2,74 ± 0,10	0,82 ± 0,09	4	sim
G+IL-6	1,68 ± 0,15	0,77 ± 0,06	4	sim	G+IL-6+A	1,33 ± 0,14	0,46 ± 0,06	4	sim
G+IL-3+SCF	4,04 ± 0,34	1,85 ± 0,11	4	sim	G+IL-3+SCF+A	4,99 ± 0,52	1,85 ± 0,17	4	sim
GM+IL-3+SCF+A	2,44 ± 0,32	1,54 ± 0,33	8	não	G+IL-6+SCF+A	0,55 ± 0,04	0,35 ± 0,07	4	não
G+IL-5	2,11 ± 0,40	1,08 ± 0,19	4	sim	G+IL-5+A	1,36 ± 0,23	0,43 ± 0,03	4	sim
GM+IL-5	2,75 ± 0,71	2,65 ± 0,32	4	não	GM+IL-5+A	2,0 ± 0,24	1,27 ± 0,15	4	não
GM+IL-6	2,56 ± 0,39	2,40 ± 0,40	4	não	GM+IL-6+A	1,94 ± 0,18	1,15 ± 0,37	4	não
IL-5+SCF	0,71 ± 0,07	0,52 ± 0,14	4	não	IL-5+SCF+A	0,63 ± 0,09	0,52 ± 0,12	4	não
IL-5+IL-6	0,32 ± 0,03	0,21 ± 0,02	4	não	IL-5+IL-6+A	0,24 ± 0,04	0,16 ± 0,04	4	não
IL-6+SCF	0,47 ± 0,05	0,30 ± 0,07	4	não	IL-6+SCF+A	0,31 ± 0,06	0,13 ± 0,04	4	sim
IL-5+IL-6+SCF	0,55 ± 0,07	0,27 ± 0,09	4	sim	IL-5+IL-6+SCF+A	0,26 ± 0,06	0,20 ± 0,01	4	não

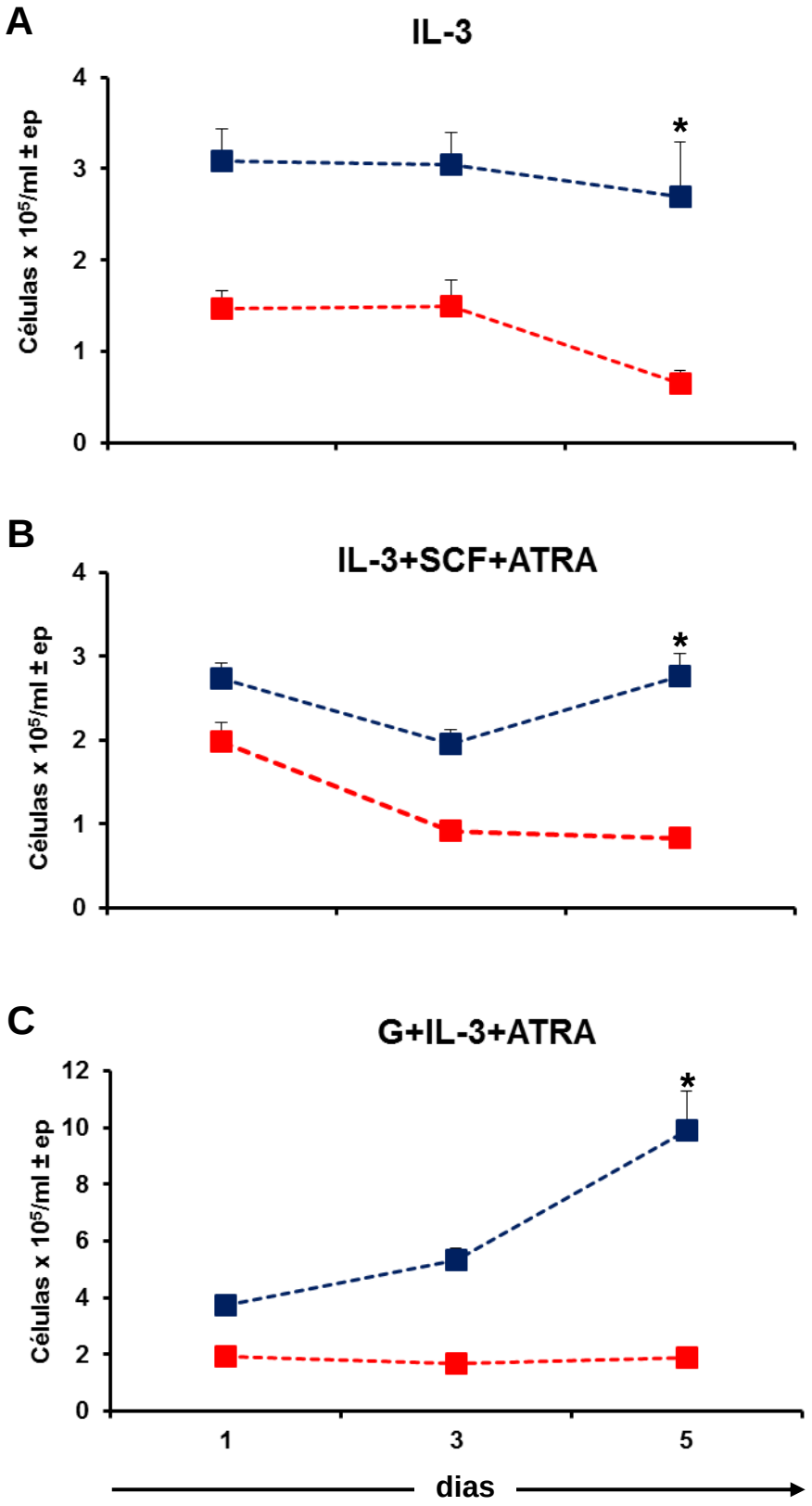
(*) Diferenças significativa entre AIRmax e AIRmin. $p<0,05$.

FIGURA 27: Resposta diferencial *in vitro* à citocinas hematopoéticas



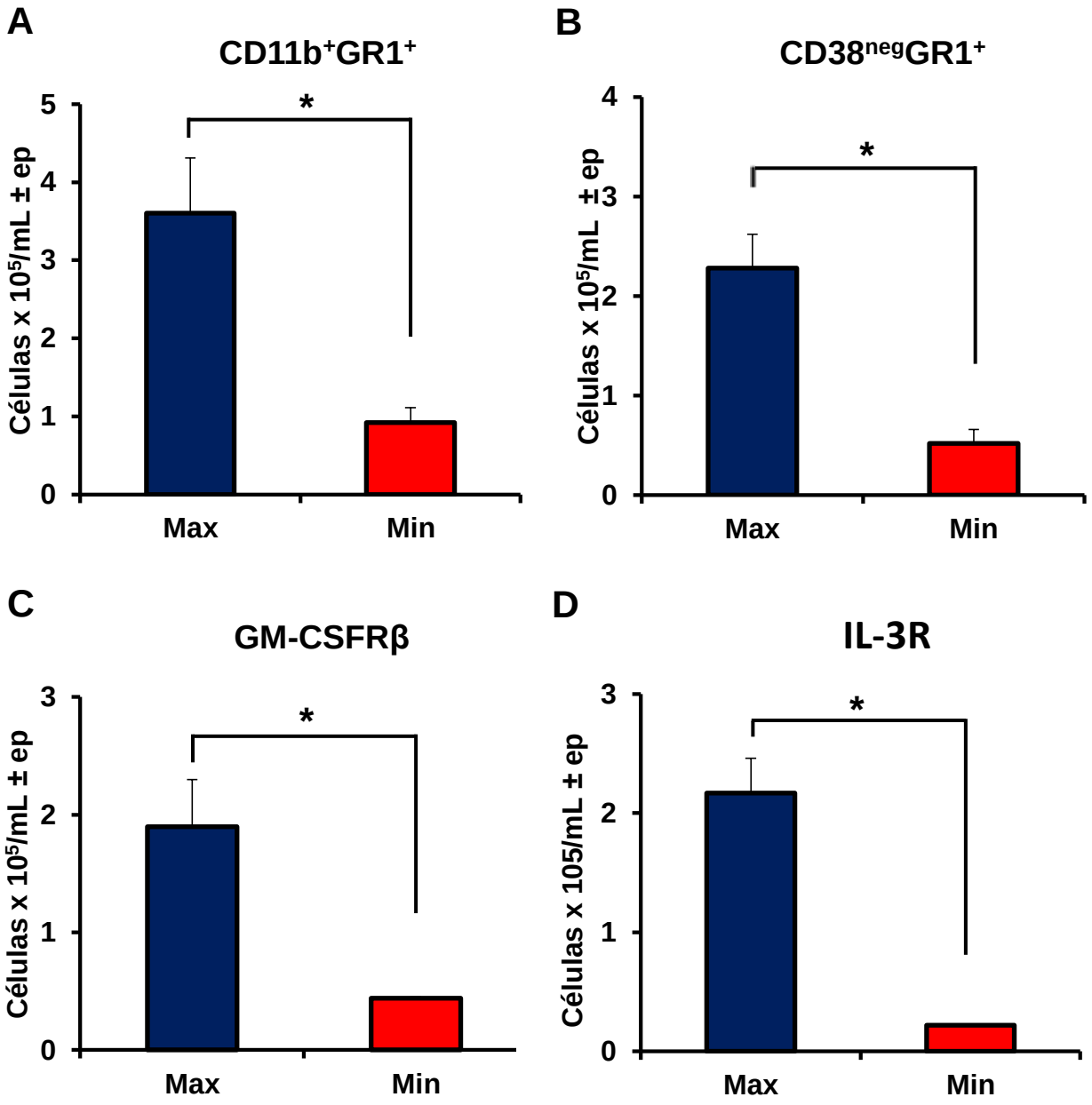
Diferença em vezes entre AIRmax e AIRmin para a resposta proliferativa das células da medula óssea a diferentes associações de fatores de crescimento hematopoético após 5 dias de cultura. Resultados de 4 experimentos independentes.
Fonte: (COSTA, 2013).

Figura 28 - Cinética de proliferação *in vitro* das células da medula óssea à citocinas hematopoéticas



Resposta proliferativa das células da medula óssea dos animais AIRmax (■) e AIRmin (■) após 1, 3 e 5 dias de cultura à 37 ºC 5% CO_2 estimuladas com os fatores de crescimento **(A)** – IL-3; **(B)** – IL-3+SCF+ATRA e **(C)** – G+IL-3+ATRA. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin. $p<0,05$. Resultados de 3 experimentos independentes.

Figura 29 - Caraterização de granulócitos e receptores de citocinas hematopoéticas nas células da medula óssea estimuladas *in vitro*



Caraterização fenotípica das células da medula óssea dos camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■), após 5 dias de cultura estimuladas com 50ng de G-CSF + 20 ng de IL-3 e ATRA 10^{-7} M. Número absoluto da população **(A) -** $CD11b^{+}GR1^{+}$, **(B)** – $CD38^{neg}GR1^{+}$, **(C)** – $CD131^{+}CD123^{neg}$ e **(D)** - $CD131^{+}CD123^{+}$. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. (*****) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin. $p<0,05$. Resultados de 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm contribuido com o entendimento do papel da inflamação na hematopoese e na regulação da mielopoese, frente a vários estímulos inflamatórios (UEDA; KONDO; KELSOE, 2005; UEDA et al., 2009; CAIN et al., 2011; Revisado em: TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012). Entretanto, os mecanismos envolvidos na mielopoese induzida pela inflamação e seu papel na modulação da intensidade da AIR foram pouco explorados. Neste contexto, o presente estudo visou contribuir com estas áreas de estudo explorando alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos na mielopoese nos tempos iniciais do desenvolvimento da AIR.

As diversas linhagens isogênicas de camundongos apresentam uma heterogeneidade quanto à capacidade de estabelecer uma resposta inflamatória aguda, como constatado em alguns modelos induzidos pela injeção s.c de Biogel P-100® no dorso, injeção i.p de tioglicolato ou ainda implante de biomateriais na cavidade peritoneal. Estes dados sugerem uma regulação poligênica do controle da intensidade da resposta inflamatória aguda (STIFFEL et al., 1990; MEDZHITOV, 2008; PLOW-HOOVER et al., 2008).

No mesmo sentido, outros estudos já evidenciaram que, entre as linhagens isogênicas de camundongos, ocorre uma grande variação quanto ao número de neutrófilos na circulação, assim como uma heterogeneidade de resposta das células da MO aos SCFs. Essa heterogeneidade de resposta foi associada, principalmente, à polimorfismos genéticos em vários genes relacionados à resposta ao GM-CSF, SCF e IL-3 (SOLLARS et al., 2006; VIETINGHOFF; LEY, 2008). Assim podemos realçar a grande influência da constituição genética dos indivíduos nos processos inflamatórios e na hematopoese (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998; RIBEIRO et al. 2003).

Considerando a vasta heterogeneidade genética presente nas linhagens AIRmax e AIRmin, acreditamos que esses animais representam um importante modelo para os estudos nesta área devido a sua maior semelhança com populações naturais. Estas duas linhagens foram produzidas com o objetivo de prover um modelo geneticamente heterogêneo (não-isogênico) relevante para o estudo de fatores genéticos que controlam a inflamação aguda. Ribeiro et al. (2003) demonstraram que três principais fatores convergentes contribuem para a maior capacidade inflamatória dos camundongos AIRmax em relação aos AIRmin, à saber:

maior resistência a apoptose dos neutrófilos do exudato; maior produção de fatores quimiotáticos no exudato e maior potencial da medula óssea em produzir neutrófilos maduros. Adicionalmente, Carneiro e colaboradores (2009) sugeriram que os caracteres genéticos da resposta inflamatória aguda podem ser mediados por diferenças no perfil de expressão gênica global das células da MO em condições basais e após o tratamento com Biogel P-100®.

Baseados nestes resultados, investigamos anteriormente a capacidade proliferativa das células da MO destes animais, obtidas em condições basais, frente ao estímulo *in vitro* com GM-CSF e ATRA. Demonstramos neste estudo um maior potencial proliferativo das células mielóides oriundas da MO dos camundongos AIRmax, em conjunto com uma maior produção de células precursoras mielóides, macrófagos e neutrófilos (COSTA, 2008).

O desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda eficaz depende, entre outros fatores, da oferta de leucócitos ao sítio de injúria que, por sua vez, depende da produção destas células nos tecidos hematopoéticos (BARTON, 2008; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005). Desta forma, nos propusemos a avaliar no presente estudo a associação entre a capacidade proliferativa dos progenitores hematopoéticos na MO e a intensidade da reatividade inflamatória aguda.

Ao longo do processo de seleção genética bidirecional segundo a intensidade da reação inflamatória aguda, os camundongos AIRmax e AIRmin aumentaram progressivamente a diferença no número de leucócitos infiltrantes no sítio inflamatório em resposta ao Biogel P-100®. Esta diferença interlinhagens após a 30° geração de acasalamentos seletivos mostrou-se 20 vezes superior nos animais AIRmax, podendo ser explicada pelo efeito aditivo de alelos distintos fixados em homozigose em QTLs que controlam a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda (BIOZZI et al., 1998). De maneira semelhante, neste estudo também documentamos a diferença fenotípica entre as duas linhagens quanto ao número total de células no exudato, com predominância de neutrófilos segmentados.

A hematopoese na homeostase mantém os níveis normais de neutrófilos circulantes. Estes leucócitos PMN são cruciais para a defesa do hospedeiro na vigência da resposta inflamatória e/ou infecções e para restaurar a homeostase do sistema. Em situações patológicas, a demanda de neutrófilos para o local de injúria estimula o aumento da granulopoese. Este processo de expansão da formação de neutrófilos é influenciado pelos níveis de citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α e

etc), fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, IL-3) e quimiocinas (KC, MCP-1, MIP-1α/β, MIP-2) produzidas no sítio inflamatório. Posteriormente, estes mediadores solúveis atingem a circulação e a MO induzindo uma rápida mobilização dos neutrófilos estocados nos nichos hematopóeticos para o sangue periférico (BASU et al., 2000; JIA et al., 2008; LAPIDOT; PETIT, 2002; RANKIN et al, 2010; WINKLER; LÉVESQUE, 2006).

As citocinas produzidas ao longo da resposta inflamatória aguda são altamente elevadas em relação aos níveis basais. Estes fatores solúveis, além de proverem um estímulo para a proliferação dos progenitores na MO, exercem um importante papel na instrução da linhagem, pois estes agem seletivamente nas HSPCs instruindo-as a diferenciarem-se em granulócitos (WANG; WAGERS, 2011).

É importante destacar que nos animais AIRmax, o aumento na produção de CSFs (G-CSF, GM-CSF) e quimiocinas no sítio de injúria ocorreu nas primeiras horas após a indução da resposta inflamatória, ao passo que nos animais AIRmin este aumento foi observado apenas em um período mais tardio (24h). Estes resultados nos permitem sugerir que os fatores solúveis produzidos no ínicio da AIR, atingem a MO e induzem, a expansão da produção de células mielóides precocemente nos animais AIRmax.

Além disso, os fatores produzidos no início da AIR parecem preparar as células na MO *in vivo* para proliferarem e diferenciarem-se, de forma que estas aumentam seu potencial de resposta proliferativa aos SCFs quando estimuladas *in vitro*. Existem evidências de que as células da MO, oriundas dos animais AIRmax após 3h do tratamento com Biogel P-100®, quando cultivadas e estimuladas *in vitro* com G-CSF+IL-3 e ATRA aumentaram significativamente a capacidade proliferativa e a diferenciação em granulócitos, em relação à resposta das células da MO oriundas deste mesmos animais em condições basais (ALBUQUERQUE; RIBEIRO, resultados não publicados). Estes resultados demonstram a importância dos fatores produzidos no início da inflamação sobre os mecanismos operantes na proliferação e diferenciação celular.

O mecanismo de mobilização da reserva de células da MO, regulado por fatores quimiotáticos, é um processo essencial da resposta inflamatória aguda. De acordo com o perfil de mediadores produzido pelo estímulo inflamatório, são mobilizados diferentes tipos celulares da MO (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005). Nossos resultados demonstraram uma maior produção das quimiocinas

atraentes de neutrófilos KC, LIX e MIP-2 no exudato dos animais AIRmax, o que contribui para explicar o maior aumento em um curto espaço de tempo, do número de neutrófilos na circulação e no exudato nestes camundongos. Burdon et al. (2005) demonstraram que a administração do MIP-2 foi capaz de induzir, em apenas 30 min, a mobilização dos neutrófilos a partir da MO em camundongos. Nossos resultados demonstraram que em condições basais os animais AIRmax e AIRmin não mostram diferenças entre si no número de leucócitos totais e de granulócitos na circulação, no entanto, na vigência da inflamação ocorreu um aumento de leucócitos totais e neutrofilia com granulócitos indiferenciados nos animais AIRmax que apresentaram níveis elevados de MIP-2 já nas primeiras 3 h de reatividade inflamatória.

Ao contrário dos animais AIRmax, os animais AIRmin apresentaram um aumento da produção de uma quimiocina atraente de monócitos, a CXCL10, indicando desde os estágios iniciais do processo inflamatório um favorecimento para a cronicidade da reação inflamatória. Condizente com este resultado, dados obtidos em nosso laboratório demonstraram a maior migração de monócitos para o sítio inflamatório em períodos tardios (48 e 96 h) da indução da AIR nos animais AIRmin (FERNANDES, 2012).

Alguns estudos demonstraram que após a administração de G-CSF em camundongos, o período de maior mobilização de leucócitos para a circulação ocorre entre 4 e 96 h. O G-CSF, que tem seus níveis aumentados em condições inflamatórias, estimula a proliferação, diferenciação e mobilização dos granulócitos na MO como também aumenta a sobrevivência destas células na MO e na circulação, prolongando a vida média de 6,5 para 11,4 h (BASU et al., 2002). No nosso modelo, os animais AIRmax mostraram um ápice da população de granulócitos circulantes às 3 h após a indução da AIR com um aumento de aproximadamente 2 vezes no número de neutrófilos $CD11b^{+}GR1^{+}$. Estes valores são relativamente inferiores aos descritos na literatura, de até 15 vezes superior àqueles observados em condições basais (ULICH et al., 1988).

Observamos também às 3 h a presença, em níveis baixos, de neutrófilos imaturos na circulação dos animais AIRmax. Estes dados corroboram as observações de Ueda et al. (2005) e Basu et al. (2002) que demonstraram que os neutrófilos imaturos são relativamente mais resistentes em responder aos sinais inflamatórios, os quais mobilizam preferencialmente os linfócitos e neutrófilos

maduros. A maior produção de neutrófilos em camundongos AIRmax em comparação aos AIRmin e isogênicos Balb/c, foi demonstrada anteriormente em ensaios de cultura de células oriundas de animais em condições basais (RIBEIRO et al, 2003). Desta forma, podemos sugerir que a neutrofilia observada em resposta ao estímulo pelo Biogel P-100® nos animais AIRmax pode ser atribuída à maior mobilização dos neutrófilos estocados na MO para o sangue e subsequentemente para o sítio inflamatório. Esta maior mobilização pode também ser conferida à maior produção de IL-1β no exudato dos animais AIRmax, além do papel das quimicionas.

As citocinas inflamatórias TNF-α, IL-6, IL-1β e muitas outras são produzidas por vários tipos celulares principalmente macrófagos e mastócitos. Estas citocinas desempenham diversas funções na resposta inflamatória, incluindo ativação das células endoteliais e leucócitos além da indução da resposta de fase aguda. Alguns trabalhos vêm elucidando o papel da citocina IL-1β no tecido hematopoético, demonstrando que os níveis aumentados desta citocina na vigência da inflamação contribuem para a mobilização dos linfócitos e favorecem a maturação dos granulócitos (MEDZHITOV, 2008; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

Além disso, estudos anteriores do Laboratório reforçam nossos resultados. Vorraro et al. (2010) observaram a maior produção de IL-1β pelas células sanguíneas dos animais AIRmax em comparação com os animais AIRmin. Este estudo definiu o locus *Irm1* (do inglês: Inflammatory response modulator 1), localizado no cromossomo 7 de camundongos, como portador de genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória e produção de IL-1β, sugerindo um papel dos fatores que regulam a síntese desta citocina com a diferente capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória entre os animais AIRmax e AIRmin.

Nossos dados demonstraram que os animais AIRmax apresentaram maior celularidade na MO do que os animais AIRmin em condições basais, indicando que fatores genéticos herdados diferencialmente nas duas linhagens influenciam a proliferação e a diferenciação dos progenitores mielocíticos. No mesmo sentido, verificamos que a inflamação induziu o aumento da produção de leucócitos na MO apenas nos animais AIRmax. Ueda et al. (2005) isolaram diversas subpopulações de granulócitos e demonstraram que os promielócitos e mielócitos da MO são células mitoticamente ativas capazes de proliferarem. Observamos nos animais AIRmax um rápido aumento de promielócitos, mielócitos e neutrófilos segmentados após o estímulo inflamatório, enquanto que nos animais AIRmin não houve alteração

significativa na produção de células hematopoéticas totais e das subpopulações de granulócitos na vigência da inflamação. Após 24 h de reação inflamatória, observamos uma queda significativa da celularidade total da MO nos animais AIRmax. Este resultado corrobora os dados de neutrofilia e reforçam nossa hipótese de que ocorre maior mobilização de neutrófilos para a circulação e sítio de injúria nesta linhagem.

Semelhantemente à linhagem AIRmin, um estudo demonstrou que a celularidade da MO avaliada nos períodos de 3, 24 e 72 h da inflamação induzida por Biogel P-100® no dorso de camundongos Swiss e C57BL/6, também não induziu alterações significativas na MO em relação aos seus respectivos controles basais (HERODIN; BENICHOU, 1987). Sugerindo que os animais AIRmax possam ter uma regulação acelerada da mielopoese emergencial.

Fiévez e colaboradores (2007) descreveram alguns fatores que podem contribuir para o aumento da celularidade na MO, fatores estes que foram constatados nos animais AIRmax no presente estudo, como: *i*) maior produção de citocinas hematopoéticas no exudato e/ou soro; *ii)* rápida expansão dos progenitores granulocíticos em resposta ao estímulo inflamatório e *iii*) alta capacidade proliferativa em resposta à fatores de crescimento hematopoéticos. A inflamação induz alterações em praticamente todas as subpopulações de células hematopoéticas da MO. A expansão do compartimento granulocítico é balanceada pela depleção da linfopoese acarretada por apoptose ou devido à mobilização dos linfócitos. Nossos resultados demonstraram que ambas as linhagens diminuíram o número de linfócitos B na MO após a inflamação, concordando com os modelos de competição por espaço propostos para a mielopoese e linfopoese pelo grupo de Ueda et al. (2004) e (2005). Os sinais inflamatórios reduzem a expressão dos fatores de desenvolvimento dos linfócitos e a ação dos mecanismos de retenção ocasionando a mobilização dos linfócitos, que ocupam o mesmo nicho que as células mielóides, da MO para os órgãos linfóides secundários (UEDA et al., 2004; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

A inflamação desencadeia uma granulopoese emergencial por meio de um mecanismo de *feedback* dependente da densidade celular, ou seja, quanto maior ou mais antecipada for a liberação dos neutrófilos maduros da MO, menor a densidade e maior espaço livre disponível para a proliferação dos progenitores. Hirai e colaboradores (2006) demonstraram que a mobilização da reserva de neutrófilos

durante a inflamação aguda ativa mecanismos de *feedback* que aumentam a produção de G-CSF. Observamos que os animais AIRmax aumentam a produção de G-CSF nas primeiras horas da inflamação e que também liberam os neutrófilos maduros antes dos animais AIRmin. Estes dois fatores em conjunto poderiam explicar o maior número de CMP na linhagem AIRmax 1 h 30 min da indução da inflamação (CAIN et al., 2011; UEDA et al., 2009).

Consistente com outros estudos de granulopoese em camundongos C57BL/6 estimulados com as citocinas inflamatórias IL-1β e TNF-α (FIÉVEZ et al., 2007), os animais AIRmax e AIRmin não mostraram diferenças significativas na população de células-tronco hematopoéticas em condições basais ou após a indução da inflamação. Consistente com nossos resultados, evidências presentes na literaura sugerem que a expansão da hematopoese em resposta a um estímulo inflamatório ocorre principalmente pela proliferação dos progenitores multipotentes (FOUDI et al., 2009; WILSON et al., 2008; TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012).

Os fenótipos observados nos animais AIRmax em resposta à inflamação induzida pelo Biogel P -100® são semelhantes aos fenótipos mediados pela ação e/ou produção aumentada de G-CSF já descritos na literatura. São eles: *i*) taxa aumentada de proliferação dos precursores granulocíticos, resultando em uma elevada proporção de mieloblastos e promielócitos na MO em relação a condição basal; *ii*) os progenitores granulocíticos progridem mais rapidamente no ciclo celular, dividindo-se consequentemente com maior frequência; *iii*) o tempo de diferenciação em neutrófilos maduros é antecipado, permitindo uma mobilização acelerada e a elevação do número de neutrófilos na circulação; *iv*) o promotor de gene *Gcsf* contém sítios de ligação para *Cebpb* que ao ligar-se desencadeia o aumento da expressão de *Gcsfr*; *v*) *Cebpa*, *Cebpb* e *Pu.1* são genes responsivos ao G-CSF, portanto, quanto maior os níveis destas citocinas produzidas na resposta inflamatória maior a modulação destes genes que se mostram fundamentais para a mielopoese emergencial (DUNN et al., 1994; LORD et al., 1991; PANAPOULOS et al., 2008).

Da mesma forma, fenótipos observados em linhagens isogênicas de camundongos deficientes de alguns fatores de transcrição são semelhantes aos observados nos animais AIRmin, onde destaca-se: *i*) granulopoese reduzida semelhante à observada em camundongos deficientes de NF-KB p50 ao estímulo com G-CSF *in vivo*; *ii*) ausência de granulopoese emergencial após a indução da

inflamação, da mesma maneira que camundongos deficientes de STAT5 quando estimulados com IL-1β e TNF-α; *iii*) menor resposta proliferativa a citocinas hematopoéticas assim como camundongos deficientes de STAT5; *iv*) mielopoese prejudicada levando a uma demorada diferenciação terminal dos neutrófilos assim como a observada em camundongos deficientes de JAK3 (FIÉVEZ et al., 2007; GROSSMAN et al., 1999; WANG et al., 2009).

Sugere-se, portanto, que os fatores genéticos herdados pelas linhagens AIRmax e AIRmin ao longo do seu processo de seleção influenciaram diversos aspectos regulatórios da mielopoese, pressionando os animais com alta capacidade inflamatória a desenvolverem uma maior capacidade de responder à situações de estresse que demandam um grande aporte celular. Como os neutrófilos são células críticas em processos inflamatórios e/ou infecciosos, o aumento da produção de progenitores de granulócitos é determinante para a imunidade a fim de gerar uma resposta imunológica efetora e também reconstituir o sistema de defesa (MACNAMARA et al., 2009). Esta resposta imune efetora foi anteriormente demonstrada nestas linhagens em infecções experimentais por *Salmonella enterica sorotipo* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*, onde os animais AIRmax apresentaram maior resistência do que os AIRmin com diferenças nas DL50 de cerca de 1000 e 100 vezes, respectivamente (ARAÚJO et al., 1998).

A mielopoese é regulada por uma variedade de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. As células hematopoéticas respondem de forma rápida e efetiva às citocinas do microambiente por meio da sinalização mediada por receptores de superfície celular. Os receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5 são expressos em baixa afinidade e no momento da ligação da citocina apropriada, estes dimerizam com a subunidade correspondente e tornam-se receptores de alta afinidade mediando efetivamente a sinalização celular (Revisado em: LOPEZ et al., 2010).

Uma vez confirmada a nossa hipótese inicial, de que a alta intensidade da AIR dos animais AIRmax, em relação aos animais AIRmin, estava associada com uma maior capacidade de expansão das células progenitoras da MO, investigamos de maneira mais aprofundada alguns mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo. Para tanto, avaliamos a expressão proteica do GM-CSFRβ e IL-3R nas HSPCs. Nossos resultados demonstraram que ambas as linhagens apresentaram o mesmo nível de expressão destes receptores. Em

contrapartida, os animais AIRmax mostraram que a indução da inflamação propiciou o surgimento de uma população com baixa expressão de GM-CSFRβ. Além disso, acreditamos que devido à maior capacidade proliferativa das HSPCs, a linhagem AIRmax mostrou expansão do número de células expressando os receptores GM-CSFRβ e IL-3R nos períodos iniciais da inflamação

Nossos resultados de expressão gênica demonstraram a existência de níveis aumentados do RNAm dos receptores de fatores de crescimento nas células da MO dos animais AIRmax quando estimuladas, em relação às condições basais e aos animais AIRmin. Embora nossos resultados não demonstrem uma correlação entre a expressão do RNAm e a presença do receptor na superfície celular, pode-se inferir que estes animais AIRmax são potencialmente mais capazes de sintetizar as respectivas proteínas do que os AIRmin. Apesar dos perfis de expressão do RNAm proverem uma poderosa abordagem na caracterização das mudanças nos processos biológicos, esta abordagem detecta apenas as mudanças em nível transcricional, enquanto que vários genes também sofrem o processo de regulação pós-transcricional, envolvendo a estabilidade do RNAm, taxa da tradução e a estabilidade da proteína (GYGI et al., 1999). Além disso, foi demonstrada uma baixa correlação entre os níveis de expressão de RNAm e a composição proteica ao longo do processo de diferenciação neutrofílica *in vitro* (LIAN et al., 2002; ZHENG et al., 2001). Outros estudos também mostram evidências de uma baixa correlação entre os níveis de expressão de RNAm e a expressão de proteínas em diversos produtos gênicos envolvidos no processo de diferenciação das células-tronco hematopoéticas (UNWIN et al., 2006).

As células mielóides possuem muitas proteínas que medeiam o reconhecimento, ingestão e destruição de organismos estranhos, apresentação de antígenos, produção de citocinas e outras funções do sistema imune. A maioria dos genes que regulam a diferenciação mielóide é controlada em nível transcricional (SHIVDAVASANI; ORKIN, 1996). Neste sentido, estudos vêm demonstrando que alguns genes e fatores de transcrição quando regulados positiva ou negativamente podem modular o fenótipo de celularidade. Os fatores de transcrição como C/EBPα e C/EBPβ desempenham um papel essencial na regulação do tempo da granulopoese. A celularidade da MO na homeostase é normalmente mantida por um processo dependente da expressão do fator de transcrição C/EBPα. Por outro lado, a inflamação acelera a granulopoese e facilita a proliferação dos progenitores

mielóides em resposta aos sinais inflamatórios por um mecanismo distinto dependente de C/EBPβ (CAIN et al., 2011; HIRAI et al., 2006;).

Condizente com estes estudos, nossos resultados também demonstraram um aumento da expressão do gene *Cebpb* nas HSPCs nos animais AIRmax. A literatura descreve que o aumento da expressão deste fator confere uma maior capacidade de proliferação em resposta às citocinas hematopoéticas. O *Cebpb* possui o potencial de acelerar a progressão do ciclo celular e ligar-se ao promotor de genes de resposta imediata como c-fos e c-jun e ainda de genes de receptores de G-CSF e GM-CSF, aumentando, com isto, a transcrição dos mesmos (HIRAI et al., 2006; JIA et al., 2008). Cain et al. (2011) sugeriram ainda que o C/EBPβ é um fator de transcrição essencial para a rápida e eficiente diferenciação terminal dos neutrófilos na granulopoese emergencial, exercendo seu papel principalmente na fase terminal de maturação. Embora tenham sido detectadas alterações nos níveis do *Cebpb* nos animais AIRmax, não foram observadas alterações significativas na expressão de *Cebpa* em ambas as linhagens.

O nível de expressão do gene *Pu.1* também foi diferente entre as duas linhagens, sendo maior nas células originadas dos camundongos AIRmax em condições basais ou após o estímulo inflamatório. Os sítios de ligação do gene *Pu.1* são encontrados em quase todos os promotores específicos de genes mielóides, especialmente naqueles codificadores dos receptores de citocinas, M-CSF, GM-CSF e G-CSF. Além disso, PU.1 pode ligar-se e modular o seu próprio promotor. O fato de *Pu.1* ser expresso em células mielóides e de se ligar a diversos promotores mielóides, sugere um importante papel deste fator de transcrição na diferenciação de células mielóides. Foi demonstrado que camundongos deficientes de *Pu.1* produzem apenas células mielóides nos estágios iniciais da diferenciação, e que estes recuperam a capacidade de produzir células maduras após a transdução retroviral deste gene (DEKOTER et al., 1998; ROSMARIN et al., 2005).

Os eventos de proliferação, comprometimento, diferenciação e sobrevivência são coordenados por meio de interações entre as células e destas com componentes da matrix extracelular, pela ação de fatores solúveis que são produzidos localmente ou chegam a partir da circulação, além dos mecanismos intrínsecos regulados em parte pelos eventos estocásticos. É a interação destes mecanismos intra e extracelulares que culmina em uma resposta de expressão de genes específicos (GARLAND et al., 1997; THOMPSON et al., 1994).

O comprometimento celular, por sua vez, é fortemente influenciado pelas citocinas, incluindo G-CSF e GM-CSF, cuja ação sinérgica ou isolada destes fatores estimula a diferenciação para as mesmas linhagens celulares, como demonstrado em ensaios *in vitro* e *in vivo* (METCALF, 2008; RIEGER et al., 2009). Ao contrário das divergências de opiniões quanto ao papel do microambiente, da interação com o estroma da MO, de influências externas e de fatores estimuladores de crescimento no destino para um tipo celular específico, o papel desempenhado pelos fatores de transcrição no comprometimento de uma linhagem celular está bem estabelecido. Os membros da família de fatores de transcrição CEBPs e o PU.1 são reguladores chave do desenvolvimento e comprometimento das células mielóides. Os níveis de PU.1 induzidos pelo C/EBPα conduzem os padrões de expressão gênica influenciando na determinação dos progenitores granulócitos- macrófagos (GMPs) entre a linhagem monocítica e granulocítica (FRIEDMAN, 2007; ROSMARIN et al., 2005).

Observamos que a combinação de diversos fatores hematopoéticos associados ou não ao ATRA foram capazes de induzir proliferação e diferenciação celular *in vitro* nas duas linhagens. Entretanto, nossos resultados demonstraram que os animais AIRmax apresentaram maior capacidade de proliferação das células da MO e de diferenciação em neutrófilos do que os animais AIRmin, principalmente quando estimulados com G-CSF+IL-3+ATRA.

Os fatores de crescimento de células mielóides estimulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras multipotentes e aumentam a expressão de vários genes em resposta ao ATRA, incluindo aqueles sabidamente envolvidos na diferenciação granulocítica. A ação sinérgica destes fatores com o ATRA induz o aumento da expressão de CD38 que contribui para a propulsão da diferenciação induzida pelo ácido retinóico e para a progressão no ciclo celular pela passagem da fase de G0 para G1 (BURGESS; METCALF, 1980; SHIMIZU; TAKEDA, 2000; SHIMIZU et al., 2006). A adição de ATRA às culturas favoreceu o aumento da diferenciação celular, sobretudo na linhagem AIRmax, onde observou - se um aumento no número de células com alta expressão de CD38 (ALBUQUERQUE; RIBEIRO, resultados não publicados) e dos receptores GM-CSFRβ e IL-3Rα. Sugerimos que esta última constatação em conjunto com a expressão diferencial dos fatores de transcrição *Cebpb* e *Pu.1*, observada nas HSPCs *in vivo*, contribuem

para a maior de proliferação e diferenciação em granulócitos das células da MO dos animais AIRmax.

Além disso, também associamos a expressão dos fatores de transcrição e o número de células expressando receptores de fatores de crescimento mielóide a observação de que ocorre uma polarização para diferentes linhagens celulares nestes animais. Nossos resultados de ensaio clonogênico das células da MO demonstraram que as células progenitoras obtidas dos animais AIRmax proliferaram e diferenciaram-se para progenitores granulócitos-macrófagos, ao passo que as células dos animais AIRmin desenvolveram preferencialmente progenitores de macrófagos em resposta a mesma combinação de SCFs. Para explicar estas observações nos fundamentamos no modelo permissivo de comprometimento das células hematopoéticas. Esta hipótese sugere que as citocinas agem principalmente por meio de ações permissivas promovendo a sobrevivência seletiva de células progenitoras e multipotentes que expressam o receptor específico e os fatores de transcrição que favoreçam a diferenciação para uma determinada linhagem celular (Revisado em: BUZA-VIDAS, 2007).

Estes resultados em conjunto reforçam o papel da constituição genética na regulação da mielopoese e no comprometimento celular. Resultados anteriores do nosso grupo sustentam ainda mais a nossa hipótese de que a pressão seletiva para obtenção das linhagens AIR conferiu maior comprometimento celular para granulócitos nas linhagens AIRmax e para monócitos/macrófagos na linhagem AIRmin frente aos mesmos estímulos externos. Também foi demonstrado um maior número de G-CFU e GM-CFU nos animais AIRmax e da mesma forma, maior número de M-CFU nos animais AIRmin nos ensaios clonogênicos frente ao estímulo multilinhagens, o PWMC (Do inglês [Pokeweed conditioned médium]) (RIBEIRO FILHO, 1994).

Baseados na resposta das células da MO a várias combinações de fatores hematopoéticos e a produção local ou sistêmica de proteínas relacionadas com a mielopoese, iniciamos a identificação global das proteinas expressas nas células da MO dos animais AIRmax e AIRmin afim de entender melhor as diferenças fenotípicas na mielopoese basal e emergencial nestas linhagens. Este estudo foi iniciado utilizando a técnica de gel em duas dimensões (SDS-PAGE 2D) dos lisados celulares da MO de animais AIRmax e AIRmin tratados ou não com Biogel P100®. Os resultados mostraram diferenças quantitativas e qualitativas do perfil proteico nos

diferentes períodos avaliados. As várias proteínas (spots) detectadas estão presentes nos géis das duas linhagens ao longo de toda a cinética com variações interlinhagens. Estes perfis de expressão proteica podem ser observados nos géis representativos de cada grupo apresentados no **Anexo B**. Esta abordagem terá continuidade por meio da identificação das proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens por espectrometria de massa (MALDI-TOF).

Concluindo, o desenvolvimento do presente estudo baseou-se na investigação da regulação da mielopoese, principalmente nos períodos iniciais da resposta inflamatória aguda, explorando os aspectos celulares e moleculares envolvidos em ambas as respostas. Além disso, pudemos destacar, a partir dos nossos resultados, a importância da constituição genética de um indivíduo na regulação do sistema hematopoético determinando, assim, a eficácia da resposta da medula óssea a uma injúria tecidual. Dessa forma, este estudo contribui para o entendimento de aspectos quantitativos da inflamação na imunovigilância e na modulação de patologias onde a resposta inflamatória mostra-se relevante. Poderemos também chegar à identificação de genes que regulam diferentemente a viabilidade, proliferação e diferenciação celular ao longo do processo de formação de neutrófilos, visto que, a regulação da maquinaria hematopoética durante uma condição de estresse é crítica para o estabelecimento de uma defesa efetora em infecções, neoplasias e em doenças autoimunes.

Estas linhagens, AIRmax e AIRmin, representam um modelo genético apropriado para o estudo da mielopoese e seu impacto na susceptibilidade a uma variedade de doenças. A combinação de genes fixados nestas linhagens pelo processo seletivo pode ter paralelo em populações humanas com consequências importantes na saúde individual.

6 CONCLUSÕES

Após a indução da resposta inflamatória, observamos:

i) Apenas nos animais AIRmax um aumento de leucócitos totais na circulação e neutrofilia com a presença de granulócitos indiferenciados

ii) Nos animais AIRmax a produção precoce, em relação aos animais AIRmin, dos fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF, das citocinas IL-6 e IL-10 e ainda das quimiocinas atraentes de neutrófilos KC, MIP-2 e LIX;

iii) Nos animais AIRmin aumento da produção de CXCL10, quimioatrante de monócitos, quando comparados aos animais AIRmax;

iv) Nos animais AIRmax apresentaram maior da celularidade da MO com produção aumentada de granulócitos em diversos estágios de diferenciação granulocítica, quando comparados aos animais AIRmin;

v) Expansão de progenitores mielóides comuns (CMP);

vi) Maior número de HSPCs e células totais da MO expressando os receptores de superfície GM-CSFRβ e IL-3R nos animais AIRmax;

vii) Regulação positiva de expressão do RNAm de receptores de fatores de crescimento mielóide nos animais AIRmax;

viii) Regulação positiva do RNAm dos fatores de transcrição C/EBPβ e PU.1 nas HSPCs da MO nos animais AIRmax;

ix) Maior capacidade proliferativa das células da MO frente a estimulação com fatores de crescimento mielóide.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABRAMSON, J. S.; WHEELER, J. G. **The neutrophil**. Oxford: IRL. Press at oxford University Press, 1993

AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. L. A clonogenic common myeloid progenitors gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, p. 193-197, 2000.

ANDERSON, K. L.; SMITH, K. A.; PIO, F.; TORBETT, B.; MAKI, R. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. **Blood**, v. 92, p. 1576-1585, 1998.

ANDERSON, K. L.; SMITH, K .A.; PERKIN, H.; HERMANSON, G.; ANDERSON, C. G.; JOLLY, D. J.; MAKI, R. A.; TORBETT, B. E. PU.1 and the granulocyte and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2310-2318, 1999.

ANGIOLILLO, A, L.; SGADARI, C.; TAUB, D, D.; LIAO, F.; FARBER, J, M.; MAHESHWARI, S.; KLEINMAN, H, K.; REAMAN, G, H.; TOSATO, G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 155–162, 1995

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W.H.K.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol**., v. 28, p. 2913-2920, 1998.

ASHCROFT, G. S. et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing anda n imparied local inflammatory response. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 260-266, 1999.

ASHCROFT, G. S.; LEI, K.; JIN, W. ; LONGENECKER, G. ; KWLKARNI, A. B. ; GREENWELL-WILD, T. ; HALE-DONZE, H. ; MCGRADY, G. ; SONG, X. Y. ; WAHL, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. **Nat. Med.**, v. 6, p. 1147-1453, 2000

BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y.; GOODEL, M. A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. **Trends Immunol.**, v. 32, n. 2, p. 57-65, 2011.

BARTON, G. M. A. A calculated response: control of inflammation by the immune system. **J. Clin. Invest**., v. 118, p. 413-420, 2008

BASU, S.; HODGSON, G.; ZHANG, H. H.; KATZ, M.; QUILICI, C.; DUNN, A. R. Emergency granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to Candida Albicans infection. **Blood**, v. 95, p. 3725-3733, 2000

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**. NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASU, S.; HODGSON, G.; KATZ, M.; DUNN, A. R. Evaluation of role of G-CSF in the production , survival, and release of neutrophil from bone marrow into circulation. **Blood**, v. 100, p. 854-861, 2002

BERLINER, N. Molecular biology of neutrophil differentiation. **Curr. Opin. Hematol**., v. 5, p. 49-53, 1998.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A., ARAUJO; L .M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT´ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 337-246, 1998.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-352, 1997.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 24, p. 657-670, 2010

BURDON, P. C.; MARTIN, C.; RANKIN, S. M. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR+CXC chemokines. **Br J. Hematol.**, v. 142, p. 100-108, 2008

BROXMEYER, H. E.; HOGGAT, J.; O'LEARY, H. A.; MANTEL, C.; CHITTETI, B. R.; COOPER, S.; MESSINA-GRAHAM, S.; HANGOC, G.; FARAG, S.; ROHRABAUGH, S. L.; OU, X.; SPETH, J.; PELUS, L. M.; SROUR, E. F.; CAMPBELL, T. B. Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis. **Nat. Med.,** v. 18, n.12, p. 1786-1796, 2012

BURGESS, A. W.; METCALF, D. The natures and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v. 56, n. 6, p. 947-958,1980

BUZA-VIDAS, N. Cytokine regulation of hematopoietic stem cells and lymphopoiesis. 2007. 116p [Ph.D. Thesis] – Boston: Harvard Medical School, 2007

CAIN, D. W.; SNOWDEN, P. B.; SEMPOWSKI, G. D.; KELSOE, G. Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. 1-12, 2011

CANCELAS, J. A.; WILLIAMS, D. A. Rho GTPases in hematopoietic stem cell functions. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 16, p. 249-254, 2009

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O .G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1571-9, 2002

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected

for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators.**Toxicon**, v. 52, n. 5, 619-27, 2008

CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; CABRERA, W. H.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Gene expression profiles of boné marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: seraching for genes in acute inflammation modifier loci. **Immunology**, v. 128, p. 563-571, 2009

CEREDIG, R.; ROLLINK, A. G.; BROWN, G. Model of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. **Nat. Rev. Immunol**., v. 9, n. 4, p. 293-300, 2009

CHANBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J.,** v.10, p. 940-954, 1996.

COLOTTA, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Modulation of granulocytic survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood,** v. 80, p. 2012-2020, 1992

COSTA, L. L. M. A. **Mielopoese em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** 2008. 101f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédias, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CRISTOPHER, M. J.; LINK, D. Regulation of neutrophil homeostasis. **Curr Opin Hematol**., v. 14, p. 3-8, 2007

DAR, A.; SCHAJNOVITZ, A.; LAPID, K.; KALINKOVICH, A.; ITKIN T.; LUDIN, A.; KAO, W-M.; BATTISTA, M.; TESIO, M.; KOLLET, O.; COHEN, N, N.; MARGALIT, R.;BUSS, E, C.; BALEUX,F.; OISHI, S.; FUJII,N.; LAROCHELLE, A.; DUNBAR, C. E.; BROXMEYER, H, E.; FRENETTE, P, S.; LAPIDOT, T. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and cathecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. **Leukemia**, v. 25, p.1286-1296, 2011

DAY, R, B; LINK, D,C. Regulation of neutrophil trafficking from bone marrow. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 69, p. 1415-1423, 2012

DE SOUZA, V. R. C.; CABRERA, W. H. K.; GALVAN, A.; RIBEIRO, O. G; DE FRANCO, M.; VORRARO, F.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; DRAGANI,T. A.; IBAÑEZ, O. M.; Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Câncer**, v. 124, p. 1478-1482, 2009.

DIDICHENKO, S. A.; SPIEGL, N.; BRUNNER, T.; DAHINDEN, C. A. IL-3 induces a Pim 1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3949-3958, 2008

DI PACE, R. F.; MASSA, S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBANEZ. O. M. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcionogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory resposiveness. **Carcinogenesis**, p. 1517-25, 2006

DEKOTER, R. P.; WALSH, J. C.; SINGH, H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. **Embo J.**, v.17, p. 4456-4468, 1998

DE VOS, A. M.; ULTSCH, M.; KOSSIOAKOFF, A. A. Human growth hormone and extracellular domain its receptor: crystal structure of the complex. **Science,** v. 255, p. 306-312, 1992

DUNN, S. M.; COLES, L. S.; LANG, R. K.; GERONDAKIS, S.; VADAS, M. A.; S HANNON, M. F. Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte-colony-stimulating factor promoter. **Blood**, v. 83, p. 2469-2479, 1994

EPLING-BURNETTE, P. K.; LIU, J. H.; CATLETT-FALCONI, R.; TURKSON, J.; OSHIRO, M.; KOTHAPOLLI, R.; LI, Y.; WANG, J. M.; YANG-YEN, H. F.; KARRAS, J.; JOVE, R.; LOUGHRAN Jr, T. P. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. **J. Clin. Invest.**, v.107, n. 3, p. 351-362, 2001

FARBER, J, M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J. Leuk. Biol**., v. 61, p. 246 -257, 1997

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**., v. 5,p. 1317-1327, 2003.

FERNANDES, J. G. **Análise comparativa dos processos inflamatórios agudo e crônico no tecido subcutâneo em camundongos selecionados para máxima ou mínima inflamação.** 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado). – Instituto de Ciências Biomédias, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FIEDLER, K.; BRUNNER, C. The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis. **Am. J. Blood Res.**, v. 2, p. 57-65, 2012

FIÉVEZ, L.; DESMET, C.; HENRY, E.; PAJAK, B.; HEGENBARTH, S.; GARZÉ, V.; BEX, F.; JASPAR, F.; BOUTET, P.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; KNOLLE, P.A.; LEO, O.; MOSER, M.; LEKEUX, P.; BUREAU, F. STAT5 is an ambivalent regulator of neutrophil homeostasis. **Plos One**, v. 8, p. 1-14, 2007

FLIEDNER, T. M.; GRAESSLE, D.; PAULSEN, C.; REIMERS, K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 17. N. 4, p. 405-426, 2002

FOUDI, A.; HOCHEDLINGER, K.; VAN BUREN, D.; SCHINDLER, J. W.; JAENISCH, R.; CAREY, V.; HOCK, H. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hemtopoietic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2009

FRAMPTON, J.; RAMQUIST, T.; GRAF, T. V-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. **Genes Dev**., v. 10, p. 2720–2731, 1996.

FRIEDMAN, A. D. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. **Oncogene**, v. 21, p. 3377-3390, 2002

FRIEDMAN, A. D. C/EBPα induces PU.1 and interacts with AP-1 and NF-Кβ to regulate myeloid development. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 340-343, 2007

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology,** v. 125, p. 281-288, 2008

GALVAN, N.; PAGE, T. J.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFCOATE, C. R. Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthrecene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. **Toxicol. Appl. Pharmacol**., v. 213. n. 2, p. 105-116, 2006

GARLAND, J. M.; QUESENBERRY, P. J.; HILTON, D. J. Colony-stimulating factors molecular and cellular biology. 2nd ed. New York: Marcell Dekker, 1997

GERY, S.; GOMBART, A, F.; FUNG, Y, K.; KOEFFLER, H, P. C/EBPepsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. **Blood**, v. 103, p. 828-835, 2004

GEWIRTZ, A. M.; CALABRETTA, B. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis. **Science**, v. 242,p. 1303–1306,1988.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001

GORDON, M. Y.; LEWIS, J. L.; MARLEY, S. B. Of mice and men and elephants. **Blood.**, v. 100, p4679-4680, 2002

GROSSMAN, W. J.; VERBSKY, J. W.; YANG, L. Dysregulated myelopoiesis in mice lacking in mice lacking JAK3. **Blood**, v. 94, p. 932-939, 1999.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analyses of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nat. Biotechnol**., v. 17, p. 994-999, 1999.

HART, J. Inflammation: Its role in the healing of acute wounds. **J. Wound Care**., v. 11, n. 6, p. 205-9, 2002.

HEISSIG, B.; HATTORI, K.; DIAS, S.; FRIEDRICH, M.; FERRIS, B.; HACKETT, N. R.; CRYSTAL, R, G.; BESMER, P.; LYDEN, D.; MOORE, M, A.; WERB, Z.; RAFIIS, S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**, v. 109, p. 625-637, 2002

HENSON, P.M. Dampening inflammation. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005

HERCUS, T. R.; THOMAS, D.; GUTHRIDGE, M. A.; EKERT, P. G.; KING-SCOTT, J.; PARKER, M. W.; LOPEZ, A. F. The granulocyte-macrphage colony-stimulating factor receptor: Linking its structure to cell signalling and its role in disease. **Blood,** 114, p. 1289-12987, 2009

HERODIN, F.; BENICHOU, G. Transient suppression of the zymosan-induced chemiluminescence produced by bone marrow cells during a subcutaneous nonspecific inflammation in the mouse. **J. Leuk. Biol.**, v. 42, p. 76-83, 1987

HERZOG, E. L; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood,** v. 102, p. 3483-3493, 2003

HESTDAL, K.; RUSCETTI, F. W.; IHLE, J. N.; JACOBSEN, S. E. W.; DUBOIS, C. M.; KOPP, W. C.; LONGO, D.L.; KELLER J. R. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. **J. Immunol**., v. 147, p. 22-28, 1991.

HIRAI H., ZHANG, P., DAYARAM, T., HETHERINGTON, C. J., MIZUNO, S., IMANISHI, J., AKASHI, K, TENEN, D. G. C/EBPβ is required for “emergency” granulopoiesis. **Nat. Immunol**., v. 7, p. 732-739, 2006

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, H. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT´ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol**., v. 22, p. 2555-2563, 1992.

ICHIHARA, M; HARA, T; TAKAGI, M; CHO, L.C; GORMAN, D. M; MIAJIMA, A. Imparied interleukin-3 (IL-3) response of the A/J mouse is caused a branch point deletion in the IL-3 receptor α subunit gene. **EMBO J**. v. 14, n. 5, p. 939-950, 1995

JIA, Y; LOISON, F; HATTORI, H; LI Y; ERNEUX, C; PARK, S.Y; GAO, C; CHAI, L; SILBERTEIN, L. E; SCHURMANS, S; LUO, H. R. Inositol Triphosphate 3-kinase B (InsP3kB) as a physiological modulator of myelopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 105, n. 12, p. 4739-4744, 2008

JOHNNIDIS, J. B.; HARRIS, M. H.; WHEELER, R. T.; STEHLING-SUN, S.; LAM, M. H.; KIRAK, O.; BRUMMELKAMP, T. R.; FLEMING, M. D.; CAMARGO. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. **Nature,** v. 451, p. 1125- 1130, 2008

KASTNER, P.; CHAN S. Function of RARaplha during the maturation of neutrophils. **Oncogene,** v. 20, p. 7178-7185, 2001

KIM, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. **J. Blood Med**., v.1, p. 13-19, 2010

KIM, C. H. Retinoic acid, immunity, and inflammation. **Vitam Horm.**, v. 86, p. 83-101, 2011

KIM, S.; PROUT, M.; RAMSHAW, H.; LOPEZ, A, F.; LEGROS, G.; MIN, B. Cuting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infections via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. **J. Immunol.**, v. 184, p. 1143-1147, 2010

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, p. 661-672, 1997.

KONDO, M.; SCHERER, D. C.; MIYAMOTO, T.; KING, A. G.; AKASHI, K.; SUGAMURA, K.; WEISSMAN, I. L. Cell-fate conversion of lymphoid-commited progenitors by instructive actions of cytokines. **Nature**, v.407, n. 21, p. 383-386, 2000

KONDO M.; WAGERS, A. J.; MANZ, M. G.; PROHASKA, S .S.; SCHERER, D. C; BEIHAK, G .F.; SHIZURU, J. A; WEISSMAN, I. L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 759-806, 2003

LABRECQUE, J.; ALLAN, D.; CHARABON, P.; ISCOVE, N. N.; LOHNES, D; HOANG, T. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha 1 and gamma. **Blood,** v. 92, p. 607-615, 1998.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophil and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v. 197, p. 139-150,1996.

LAPID, K.; SANTAR-GLAIT, C.; GUR-COHEN, S.; CANAANI, J.; KOLLET, O.; LAPIDOT, T. Egress and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells: A dynamic Multi-facet process. **In:** MELTON. StemBook, 2012. Disponível em: http://www.stembook.org.

LAPIDOT, T.; PETIT, I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines and stromal cells. **Exp. Hematol**., v. 30, p. 973-981, 2002

LAROCCA, R.; MARGUTI, I.; CABRERA, W.; RIBEIRO, O. G.; RIZZO, L. V.; VIEIRA DE MORAES, L. Maximal inflammatory response benefits sungeneic skin graft acceptance. **Inflamm. Res**. v. 57, p. 171-177, 2008

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.,**. v. 2, n. 10, p. 787-95, 2002.

LeCABEC, V.; COWLAND, J. B.; CALAFAT, J.; BORREGAARD, N. Targeting of proteins to granule subsets determined by timing not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expresses in HL60 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 6454-6457,1996.

LeCABEC, V.; CALAFAT, J.; BORREGAARD, N. Sorting of the specific granule protein, NGAL, during granulocytic maturation HL60 cells. **Blood**, v. 89, p. 2113-2121, 1997.

LEVESQUE, J.P.; TAKAMATSU, Y.; NILSSON, S, K.; HAYLOCK, D, N.; SIMMONS, P. J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 98, p. 1289-1297, 2001

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Rev**., v.7, p. 678-689, 2007

LIAN, Z.; KLUGER, Y.; GREENBAUM, D.S.; TUCK, D.; GERSTEIN, M.; BERLINER, N.; WEISSMAN, S.M.; NEWBURGER, P.E. Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program: global analysis of the gene expression during induced differentiation in MPRO cell line. **Blood**, v. 100. n. 9, p. 3209-3220, 2002

LINK, D. Neutrophil homeostasis. **Immunol. Res**., v. 32, n. 1, p. 169-178, 2005

LIONGUE, C; WRIGHT, C; RUSSEL, A. P; WARD, A. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: Stimulating granulopoiesis and much more. **J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 2372-2375, 2009

LIVAK, K. L.; SCHIMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2DDCT. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LORD, B. I.; BRONCHUD, M. H, OWENS, S.; CHANG, J.; HOWELL, A.; SOUZA, L.; DEXTER, T. M. Kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocytic colony-stimulating factor in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 9499-9503, 1989

LORD, B. I.; MOLINEUX, G.; PODJA, Z.; SOUZA, L. M.; MERMOD, J. J.; DEXTER, T. M. Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. **Blood**, v. 77, p. 2154-2159, 1991

LOPEZ, A. F.; HERCUS, T. R.; EKERT, P.; LITTER, D. R.; GUTHRIDGE, M.; THOMAS, D.; RAMSHAW, H. S.; STOMSKI, F.; PERUGINI, M.; D'ANDREA, R.; GRIMBALDESTON, M.; PARKER, M. W. Molecular basis of cytokine receptor activation. **JUBMB Life**, v. 62, n. 7, p. 509-518, 2010

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat. Immunol**., v. 6, p. 1182-1190, 2005

MACNAMARA K.C.; RACINE R.; MADHUMOULI C.; BORJESSON D.; WINSLOW G. M. Diminished hematopoietic activity associated with alterations in innate and adaptative immunity in a mouse model of human monocytic Ehrlichiosis. **Infec. and Immunity.,** v. 77, p. 4061-4069, 2009

MACNAMARA K. C.; JONES, M.; MARTIN, O.; WINSLOW G. M. Transient activation of hematopoietic stem and progenitor cells by IFN-γ during acute bacterial infection. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 1-9, 2011

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metástases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 337-342, 2001

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; MANENTI, G.; PIZZOCARO, K. F; DE FRANCO, M; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. **Oncogene,** v. 22, p. 426-432, 2003

MASSBERG, S. P.; SCHAERLI, P.; KNEZEVIC-MARAMICA, M.; KOLLNBERGER, N.; TUBO, E. A.; MOSEMAN, I. V.; HUFF, T.; JUNT, T.; WAGERS, A. J.; MAZO, I. B.; VON ANDRIAN, U. H. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph and peripheral tissues. **Cell**, v. 131, p. 994-1008, 2007

MATOS, M. S.; MATOS, P. F. Hematologia clínica. In: **Laboratório clínico médico veterinário**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 69-133,1995.

McKINSTRY, W. J.; LI, C.; RASKO, J. E. J.; NICOLA, A. N.; JOHNSON, G. R.; METCALF, D. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 89, p. 65-71, 1997 1997

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Advances in Immunology: Innate Immunity. **N. Engl. J. Med**., v. 343, p. 338-344, 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454,p. 428-435, 2008

MEANS R. T.; Jr. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. **Stem cells**, v. 13, p. 32-37, 1995

MELOTTI, P.; KU, D. H.; CALABRETTA, B. Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-myb. **J. Exp. Med**., v. 179, p. 1023–1028, 1994.

METCALF, D.; MERCHAU, S. Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granlocytes ans macrophages. **J. Cell. Physiol.**, v. 112, p. 411-418, 1982

METCALF, D., ROBB, L., DUNN, A. R., MIFSUD, S., DI RAGO, L. Role of granulocute-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. **Blood**, v. 88, p. 3755-3764, 1996

METCALF, D. Hematopoietic Cytokines. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 485-491, 2008

MIDDLETON, J.; NEIL, S.; WINTLE, J.; CLARK-LEWIS, I.; MOORE, H.; LAM, C.; AUER, M.; HUBE, E.; ROT, A. Trancytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. **Cell,** v. 91,p. 385-395, 1997

MIYAJIMA, A, MUI, A. L; OGOROCHI, T; SAKAMAKI, K: Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating actor, interleukin-3 and interleukin-5. **Blood,** v. 82, p. 1960, 1993

MOSER, B.; CLARK-LEWIS, I.; ZWAHLEN, R.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. **J. Exp. Med.**, v. 171, p. 1797-1802, 1990

MOULIN, A. M.; SILVERSTEIN, A. M. In: SHEVACH, J.J.; OPPENHEIM, E. M. **Immunophysiology**, New York: Oxford University Press, 1990. .

MUCENSKI, M. L.; MCLAIN, K.; KIER, A. B. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. **Cell**, v. 65, p. 677-689, 1991.

NAGAI, Y.; GARRET, K. P.; OHTA, S.; BAHRUN, U.; KOURO, T.; AKIRA, S.; TAKATSU, K.; KINCADE, P. W. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. **Immunity**, v. 24, p. 801-812, 2006

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol**, v. 6, p. 173-182, 2006

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 81, p. 2844-2853, 2003

PANAPOULOS, A. D.; ZHANG, L.; SNOW, J. W.; JONES, D. M.; SMITH, A. M.; EL KASMI, K. C.; LIU, F.; GOLDSMITH, M. A.; LINK, D. C.; MURRAY, P. J.; WATOWICH, S. S.; STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. **Blood**, v. 108, p. 3682-3690, 2006

PANAPOULOS, A. D. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady-state and emergency hematopoiesis. **Cytokine**, p. 42: 277-288, 2008

PAPAYANNOPOULOU, T.; NAKAMOTO, B.; ANDREWS, R. G.; LYMAN, S. D.; LEE, M. Y. In vivo effects of Flt3Flk2 ligand on mobilization of hematopoietic progenitors in primates and potent synergistic enhancement with granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 90, p. 620-629, 1997

PARTIDA - SANCHEZ, S.; COCKAYNE, D. A.; MONARD, S.; JACOBSON, E. L.; OPPENHEIMER, N.; GARVY, B.; KUSSER, K.; GOODRICH, S.; HOWARD, M.; HARMSEN, A.; RANDALL, T. D.; LUND, F. E. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. **Nat. Med.,** v. 7, n. 11, p. 1209-1216, 2001.

PELED, A.; GRABOVSKY, V.; HABLER, L.; SANDBANK, J.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; PETIT, I.; BEN-HUR, H.; LAPIDOT, T.; ALON, R. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 1199-1211, 1999

PELUS, L, M.; FUKUDA, S. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. **Exp. Hematol.**, v. 34, p. 1010 – 1020, 2006

PETERS, L. L.; CHEEVER, E. M.; ELLIS, H. R.; MAGNANI, P. A.; SVENSON, K. L.; SMITH, R.V.; BOGUE, M. A. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. **Physiol. Genomics.**, v. 11, p. 185-193, 2002

PITCHFORD, S. C.; FURZE, R. C.; JONES, C. P.; WENGNER, A. M.; RANKIN, S. M. Differential mobilization of subsets of progenitors cells from the bone marrow. **Cell Stem Cell,** v. 4, p. 62-72, 2009

PLOW-HOOVER, J. L.; GONG, Y.; SHCHURIN, A.; BUSUTTIL, S. J.; SCHNEEMAN, T. A.; HART, E. Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. **Inflamm. Res.**, v. 57, p. 457-463, 2008

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol**., v. 7, p. 803-815, 2007

PRONK, C. J.; ATTEMA, J.; ROSSI, D. J.; SIGVARDSSON, M.; BRYDER, D. Deciphering development stages of adult myelopoiesis. **Cell Cycle.**, v. 7, p. 706-713, 2008

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. **In** WILLIAMS. Hematology, 2011. Disponível em: http://www.medtextfree.com

RAMOS, A. T.; GONÇALVES, L. R.; RIBEIRO, O. G.; ROCHA, C. C. A.; SANT'ANNA, O . A. Effects of Lonomia obliqua (lepidóptera, sarturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 761-768, 2004

RANKIN, S. M. The bone marrow: the site of neutrophil clearance. **J. Leuk. Biol.**, v. 88, p. 242-251, 2010

RATAJCZAK, M. Z.; PERROTTI, D.; MELOTTI, P. Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells. **Blood**, v. 91, p. 1934–1946, 1998.

REDDY, E. P. et al. IL-3 signaling and role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. **Oncogene**, v. 19, p. 2532-2547, 2000

RIBEIRO FILHO, O. G. **Controle Genético da Inflamação**. 1994. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol**., v. 74, n.4, **p.** 497-506, 2003.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R.; STAROBINAS, N.; SEMEN, M.; IBAÑEZ, O. M. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Exp. Lung Res**., v. 31, n.1, p. 105-16, 2005.

RIEGER, M. A.; HOPPE, P. S.; SMEJKAL, B. M.; EITELHUBER, A. C.; SCHROEDER, T. Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. **Science**, v. 10, n. 325, p. 217-218, 2009

ROSMARIN, A. G.; YANG, Z.; RESENDES, K. K. Transcriptional regulation im myelopoiesis: Hematopoetic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. **Exp. Hematol,** v. 33, p. 131-143, 2005

RYAN, M. A.; NATTAMAI, K. J.; XING, E.; SCHLEIMER, D.; DARIA, D.; SENUPTA, A.; KÖHLER, A; LIU, W; GUNZER, M; JANSEN, M; RATNER, N; LECRAS, T. D.; WATERSTRAT A.; VAN ZANT, C.; CANCELAS, J. A.; ZHENG, Y.; GEIGER, H. Pharmacological inhibition of EGFR signaling enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. **Nat. Med.**, v. 16, p. 1141-1146, 2010

SADIK, C. D; KIM, N. D; LUSTER, A. D. Neutrophil cascading their way to inflammation. **Trends Immunol**., v. 32, n. 10, p. 452-460, 2011

SAKAMAKI, K.; MIYAJIMA, I.; KITAMURA, T.; MIYAJIMA, A. Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. **EMBO J**, v. 10, n.10, p. 3541-3549, 1992

SCOTT, L, M.; CIVIN, C, I.; RORTH, P.; FRIEDMAN, A, D. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. **Blood**, v. 80, p. 1725-1735, 1992

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nat. Immunol.** v. 6, p. 1199-1205, 2005

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat. Rev. Immunol**., v. 11, n. 11, p. 762-774, 2011

SHIMIZU, T.; TAKEDA, K. Induction of retinoic acid receptor α by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human myeloid leukemia cell lines. **Cancer Res**., v. 60, p. 4544-4549, 2000.

SHIMIZU, T.; ESAKI L.; MIZUNO, H.; TAKEDA, K. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances retinoic acid-induced gene expression. **J. Leuk. Biol**., v. 80, p. 889-896, 2006

SHIVDASANI, R. A.; ORKIN, S. H. The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood**, v. 87, p. 4025-4039, 1996

SIGVARDSSON, M. New light on the biology and developmental potential of hematopoietic stem cells and progenitors cells. **J. Intern. Med.**, v. 266, p. 311-324, 2009

SINGH P.; YAO Y; WELIVER A; BROXMEYER H. E; HONG S. C; CHANG H. Vaccinia virus infection modulates the hematopoietic cell compartments in the bone marrow. **Stem Cells,** v. 26: p. 1009-1016, 2008

SINGH P; HU, P.; HOGGATT, J.; MOH, A.; PELLUS, L, M. Expansion of bone marrow neutrophil following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. **Leukemia**, v. 26, p. 2375-2383, 2012

SKALNIK, D. G. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. **Gene**, v. 284, p. 1-21, 2001

SOLLARS, V. E.; PEQUINOT, E.; ROTHSTEIN, J. L.; BUCHEBERG, A. M. Analyses of expansion of myeloid progenitors in mice to identify leukemic susceptibility genes. **Mamm. Genome**., v. 17, p. 808-821, 2006

STARK, M. A; HUO, Y; BURCIN, T. L; MORRIS, M. A; OLSON, T. S; LEY, K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, p. 285-294, 2005

STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, p. 221-233, 1990.

STRYDOM, N.; RANKIN, S, M. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease**. J. Innate Immunol.,** v. 5, p. 304-314, 2013

STROBL, H.; TAKINOMOTO, M.; MAJDIC, O.; FRITSCH, G.; SCHEINECKER, C.; HOCKER, P.; KNAPP, W. Myeloperoxidade expression in $CD34^+$ normal human hematopietic cells. **Blood,** v. 82, p. 2069-2078, 1993

STRUHL, K. Yeast transcriptional regulatory mechanisms. **Annu. Rev. Genet.**, v. 29, p. 651-674, 1995

TAKIZAWA, H.; BOETTCHER, S.; MANZ, M. G. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 2991-3002, 2012

THOMPSON, A.; The cytokine handbook. London: Academic Press, p. 615, 1994

TZENG, Y. S.; LI, H.; KANG, Y. L,; CHEN, W. C.; CHENG, W. C.; LAI, D. M. Loss of Cxcl12Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem progenitor cell and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. **Blood,** v. 117, p. 429-439, 2011

TOUW, I. P.; VAN DE GEIJN, G. J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid development, leukemia and related blood cell disorders. **Front Biosc.**, v. 12, p. 800-815, 2007

UEDA Y.; YANG, K. Y; FOSTER, S. J; KONDO M; KELSOE, G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. **J. Exp. Med.,** v. 199, n. 1, p. 47-57, 2004

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE, G. Inflammation and reciprocal production of granulocyte and lymphocytes in bone marrow. **J. Exp. Med**., v. 201, p. 1771-1780, 2005.

UEDA Y.; CAIN, D. W.; KURAOKA, M.; KONDO, M, KELSOE G. IL-1R type I-Dependent hematopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. **J. Immunol.**, v. 182, p. 6477-6484, 2009

ULICH, T. R.; Del CASTILLO, J.; SOUZA, L. Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor-induced neutrophilia. **Am. J. Pathol.**, v. 133. n. 3, p. 630-638, 1988

UNWIN, R. D.; SMITH, D. L.; BLINCO, D.; WILSON, C. L.; MILLER, C. J.; EVANS, C. A.; JAWORSKA, E.; BALDWIN, S. A.; BARNES, K.; PIERCE, A.; SPOONCER, E.; WHETTON, A. D. Quantitative proteomics reveals posttranslational control as regulatory factor im primary hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 107, p. 4687-4694, 2006

VASQUEZ-BRAVO, YANIRA DE LOS ANGELES. **Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional**. 1996. 143 f. Tese de Doutorado – Departamento de Imunologia, ICB/USP, 1996

VIETINGHOFF, S. V.; LEY, K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. **J. Immunol.**, v. 181, p. 5183-5188, 2008

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritir in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol**., v. 30, p. 431-437, 2000.

VORRARO, F.; CABRERA, W. H.; CARNEIRO, P. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; SEMAN, M.; DRAGANI, T. A.; IBANEZ, O. C. Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse *Irm1* locus. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1616-1621, 2010

WALKER, F.; NICOLA, N. A.; METCALF, D.; BURGESS, A. W. Hierarquical down modulation of hematopoietic growth factor receptors. **Cell**, v. 43, n. 1, p. 269-276, 1985

WANG, D; PRIEL-PAZ, I; FRIEDMAN, A. D. NF-KB p50 regulates C/EBPα expression and inflammatory cytokine-nduced neutrophil production. **J. Immunol.**, v. 182, p. 5757-5762, 2009

WANG, L. D; WAGERS, A. J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. **Nat. Ver. Mol. Cell Biol**., v. 12, n. 10, p. 642-655, 2011

WANG, W.; WANG, X.; WARD, A. C.; TOUW, I, P.; FRIEDMAN, A, D. C/EBPα and G-CSF receptor signals cooperate to induce the myeloperoxidase and neutrophil elastase genes. **Leukemia**, v. 15, p. 779-786, 2001

WARD, A. C. The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) in disease. **Front Biosc.**, v. 12, p. 608-618, 2007

WARREL, R. P. FRANKEL, S. R.; MILLER, W.; SCHEINBERG, D. A.; ITRIL, L. M.; HITTELMAN, W. N.; VYAS, R.; ANDREEFF, M.; TORUFI, A.; JAKUBOWSKI, A.; GABRILOVE, J.; GORDON, M.S.; DMITROVSKY, E. Differentiation therapy of acute promyelocitc leukemia with retinoic (all trans retinoic acid). **N. Engl. J. Med**., v. 324, p. 1385-1393, 1991.

WILLIAMS, D. A.; ZHENG,Y.; CANCELAS, J. A. Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization. **Methods Enzymol**., v. 439, p. 365-393, 2008.

WILSON, A.; LAURENTI, E.; OSER, G.; VAN DER WATH, R.C.; BLANCO-BOSE, W.; JAWARSKI, M.; OFFNER, S.; DUNANT, C.F; ESHKIND, L.; BO CKAMP, E.; LIÓ, P.; MACDONALD, H.R.; TRUMPP, A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1118-1129, 2008

WINKLER, I. G.; LÉVESQUE, J.P. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: When innate immunity assails the cells that make blood and bone. **Exp. Hematol.**, v. 34, p. 996-1009, 2006

YAN, X. Q.; BRIDELL, R.; HARTLEY, C.; STONEY, G.; SAMAL, B.; McNIECE, I. Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 84, p. 795-799, 1994

YAÑEZ A.; MURCIANO C.; O'CONNOR, J. E. ;GOZALBO D.; GIL M. L. *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitors cells by a My-D88-dependent signalling. **Microbes Infec**., v. 11, p. 531-535, 2009

YUAN, S. Y.; SHEN, Q.; RIGOR, R. R.; WU, M. H. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvasc. Res.**, v. 83, p. 82-88, 2012

ZANGH P.; QUINTON L. J.; GAMBLE L.; BAGBY G. J, SUMMER W. R, NELSON S. The granulopoietic cytokine response and enhancement of granulopoiesis in mice during endotoxemia.**Shock,** v. 23, p. 344-352, 2005

ZANGH P.; NELSON S.; BAGBY G. J.; SIGGINS R.; SHELLITO J. E.; WELSH D. A. The lineage^{-} c-kit^{+}sca-1^{+} cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice. **Stem Cells,** v. 26, p. 1778-1786, 2008.

ANEXO A

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da resposta inflamatória aguda (continua)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
G-CSF	Basal	55,1 ± 4,5	15,4 ± 0,9		2139,5 ± 666,0	360,3 ± 95,7	*
	Biogel 1,5h	248,4 ± 40,1	68,0 ± 0,9		352,5 ± 125,8	410,1 ± 26,2	#
	Biogel 3h	1236,2 ± 11,3	535, 0 ± 95,4	#	622,9 ± 127,0	2173,6 ± 291,8	#
	Biogel 24h	5229,9 ± 536,8	1567,5 ± 98,7	# & *	3845,6 ± 87,2	4026,2 ± 628,9	&
GM-CSF	Basal	2,4 ± 2,3	0,3 ± 0,2		125,3 ± 38,9	104,3 ± 13,3	
	Biogel 1,5h	8,5 ± 6,2	0,2 ± 0,08		121,7 ± 13,1	128,4 ± 10,8	
	Biogel 3h	51,1 ± 12,5	16,06 ± 12,3	#	90,0 ± 7,2	126,8 ± 11,6	*
	Biogel 24h	91,3 ± 7,9	49,5 ± 7,7	& *	129,4 ± 4,6	273,2 ± 81,3	&
M-CSF	Basal	2,9 ± 2,4	0,14 ± 0,01		13,6 ± 2,8	19,2 ± 3,4	
	Biogel 1,5h	1,57 ± 0,5	1,0 ± 0,6		14,5 ± 5,3	14,0 ± 3,2	
	Biogel 3h	8,8 ± 0,1	5,9 ± 2,0		17,0 ± 3,4	22,0 ± 4,5	
	Biogel 24h	62,5 ± 6,0	50, 7 ± 8,5	# &	21,1 ± 0,8	22,3 ± 1,7	
IL-2	Basal	Não detectada			4,9 ± 1,0	0,8 ± 0,6	
	Biogel 1,5h				5,7 ± 2,3	2,3 ± 0,7	
	Biogel 3h				1,3 ± 0,8	3,6 ± 1,3	
	Biogel 24h				7,8 ± 2,9	4,0 ± 2,0	
IL-3	Basal	100,3 ± 73,7	0,05 ± 0,04		0,46 ± 0,4	0,27 ± 0,2	
	Biogel 1,5h	0,14 ± 0,05	3,1 ± 3,0		0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05	
	Biogel 3h	0,12 ± 0,03	0,04 ± 0,03		0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	
	Biogel 24h	3,7 ± 0,5	1,6 ± 0,87		0,3 ± 0,18	0,3 ± 0,18	
IL-4	Basal	0,5 ± 0,2	0,07 ± 0,01		0,5 ± 0,4	0,04 ± 0m03	
	Biogel 1,5h	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,08		0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,06	
	Biogel 3h	1,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1		0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,1	
	Biogel 24h	6,2 ± 1,4	0,9 ± 0,4	# *	1,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1	*

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da AIR

(continuação)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
IL-5	Basal	0,82 ± 0,2	0,4 ± 0,01		1,36 ± 0,08	1,22 ± 1,0	*
	Biogel 1,5h	2,6 ± 0,9	2,7 ± 1,6		0,8 ± 0,4	3,0 ± 1,1	#
	Biogel 3h	14,5 ± 0,3	6,1 ± 2,5	#	0,6 ± 0,4	2,6 ± 0,6	#
	Biogel 24h	31,6 ± 1,9	15,7 ± 5,3	# & *	1,7 ± 0,01	4,8 ± 1,2	&
IL-6	Basal	19,6 ± 17,6	42,3 ± 11,8		42,3 ± 11,8	12,4 ± 5,9	
	Biogel 1,5h	2243,3 ± 1040,3	61,9 ± 9,2		61,9 ± 9,2	51,0 ± 28,8	
	Biogel 3h	5671,3 ± 1790,1	164,2 ± 67,5	#	164,2 ± 67,5	89,0 ± 12,8	
	Biogel 24h	12347,4 ±1264,09	2733,4 ± 999,2	# *	2733,4 ± 999,2	97,1 ± 30,0	*
IL-7	Basal	0,28 ± 0,1	0,02 ± 0,01		9,6 ± 1,5	9,0 ± 3,6	
	Biogel 1,5h	0,76 ± 0,3	0,2 ± 0,1		40,2 ± 3,3	6,2 ± 0,7	# *
	Biogel 3h	1,8 ±0,3	0,7 ± 0,1	&	15,7 ± 8,3	5,0 ± 0,3	
	Biogel 24h	5,7 ± 0,6	0,5 ± 0,3	# &	8,3 ± 0,2	12,6 ± 0,01	
IL-9	Basal	23,4 ± 7,47	0,02 ± 0,01		80,2 ± 19,17	76,8 ± 21,4	
	Biogel 1,5h	36,9 ± 5,0	28,0 ± 2,2		168,8 ± 56,3	56,9 ± 6,57	
	Biogel 3h	47,3 ± 8,1	36,1 ± 9,7		92,5 ±36,1	102,2 ± 9,43	
	Biogel 24h	96,4 ± 13,4	58,2 ± 7,9	#	154,4 ± 25,5	654,7 ±419,8	
IL-12p40	Basal	0,2 ± 0,2	0,03 ± 0,01		4,54 ± 1,1	6,3 ± 0,4	
	Biogel 1,5h	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,04		3,2 ± 0,8	7,0 ± 1,4	
	Biogel 3h	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1		5,5 ± 1,9	9,9 ± 0,9	
	Biogel 24h	1,2 ± 0,1	0,48 ± 0,3	#	5,7 ± 0,2	8,5 ± 0,1	
IL-12p70	Basal	0,3 ± 0,1	0,09 ± 0,01		5,8 ± 1,7	5,3 ± 0,8	
	Biogel 1,5h	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,2		7,3 ± 2,3	6,3 ± 1,2	
	Biogel 3h	2,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2		9,4 ± 2,6	8,7 ± 1,6	
	Biogel 24h	6,1 ± 0,6	1,3 ± 0,7	# *	20, 8 ± 2,6	6,4 ± 0,2	# *

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da AIR

(continuação)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
LIF	Basal	0,28 ± 0,2	0,06 ± 0,01		10,34 ± 2,0	4,15 ± 3,3	
	Biogel 1,5h	1,12 ± 0,4	0,3 ± 0,1		2,68 ± 2,0	2,9 ± 1,0	
	Biogel 3h	4,25 ± 0,3	0,9 ± 0,2		6,3 ± 3,7	0,2 ± 0,1	
	Biogel 24h	138,7 ± 31,7	6,4 ± 4,2	# *	1,39 ± 0,1	5,1 ± 2,3	
LIX	Basal	53,4 ± 16,8	128,6 ± 36,5		1085,1 ± 222,0	1774,5 ± 578,5	
	Biogel 1,5h	95,6 ± 27,6	124,9 ± 58,6		292,9 ± 107,0	1781,0 ± 913,0	
	Biogel 3h	57,0 ± 5,1	213,3 ± 27,7		791,6 ± 323,2	2340,3 ± 951,3	
	Biogel 24h	101,2 ± 47,2	195,1 ± 21,3	# *	836,8 ± 56,2	1780,9 ± 305,3	
Eotaxina	Basal	24,8 ± 8,3	24,7 ± 16,8		1680,6 ± 98,4	1111,4 ± 105,7	
	Biogel 1,5h	126,1 ± 0,08	73,8 ± 8,4		1473,3 ± 116,7	1224,1 ± 68,6	
	Biogel 3h	254,5 ± 21,4	164,0 ± 15,7		1510,8 ± 64,5	1691,1 ± 157,5	
	Biogel 24h	190,6 ± 22,7	224,1 ± 92,0	# &	1565,2 ± 91,6	2171,4 ± 57,3	
CXCL10	Basal	35,2 ± 28,2	60,9 ± 36,4		448,2 ± 126,5	495,4 ± 16,7	
	Biogel 1,5h	31,0 ± 3,9	34,9 ± 8,5		252,6 ± 10,6	359,4 ± 11,7	
	Biogel 3h	303,1 ± 21,3	377,4 ± 100,9		385,4 ± 27,0	653,6 ± 15,7	
	Biogel 24h	169,3 ± 12,0	4997,3 ± 2247,1	&*	536,7 ± 71,2	896,5 ± 63,4	
KC	Basal	7,6 ± 7,4	2,2 ± 2,0		257,4 ± 87,5	36,8 ± 7,6	
	Biogel 1,5h	758,6 ± 121,6	484,9 ± 81,7		15,5 ± 3,3	63,6 ± 9,7	
	Biogel 3h	1283,7 ± 162,3	812,0 ± 156,5	#	148,3 ± 22,0	222,5 ± 61,9	
	Biogel 24h	832,6 ± 183,6	113,4 ± 72,9	# *	583,4 ± 134,8	215,0 ± 92,3	# *
MCP-1	Basal	8,5 ± 8,2	0,2 ± 0,01		40,82 ± 9,4	18,2 ± 0,01	
	Biogel 1,5h	86,2 ± 17,4	54,2 ± 24,9		30,3 ± 0,7	22,1 ± 0,7	
	Biogel 3h	560,0 ± 104,6	74,2 ± 26,7	#	50,8 ± 13,5	44,2 ± 9,2	
	Biogel 24h	339,9 ± 96,1	238,7 ± 56,8	#	112,6 ± 4,0	38,2 ± 3,0	

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da AIR (continuação)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
MIG	Basal	1,42 ± 1,1	5,6 ± 5,3		1058,1 ± 305,7	705,3 ± 69,7	*
	Biogel 1,5h	1,9 ±0,7	1,3 ± 0,7		1085,5 ± 60,3	739,2 ± 93,1	#
	Biogel 3h	8,3 ± 2,0	3,9 ± 2,1		693,2 ± 42,0	821,3 ± 17,2	#
	Biogel 24h	104,0 ± 30,9	92,6 ± 22,8	# &	864,4 ± 5,0	840,6 ± 51,0	&
MIP-1α	Basal	25,7 ± 17,7	14,9 ± 6,9		30,9 ± 5,7	20,9 ± 2,3	
	Biogel 1,5h	65,3 ± 3,6	92,5 ± 19,8		106,7 ± 26,8	38,3 ± 9,5	
	Biogel 3h	254,2 ± 4,5	170,9 ± 17,6		21,7 ± 3,0	30,4 ± 2,8	
	Biogel 24h	2886,9 ± 868,3	333,3 ± 60,4	# *	206,9 ±19,9	89,4 ± 2,0	& # *
MIP-1β	Basal	5,9 ± 5,6	2,0 ± 1,7		25,3 ± 7,8	24,3 ± 4,2	
	Biogel 1,5h	27,6 ± 2,2	68,2 ± 24,8		36,6 ± 12,9	25,1 ± 2,9	
	Biogel 3h	365,2 ± 57,9	219,0 ± 45,5		24,5 ± 5,3	19,05 ± 4,0	
	Biogel 24h	1193,7 ± 151,5	576,3 ± 214,3	# &*	88,3 ± 5,1	35,6 ± 6,3	
MIP-2	Basal	4,9 ±, 4,1	0,20 ± 0,01		29,4 ± 4,5	19,4 7 ± 2,9	
	Biogel 1,5h	264,1 ± 52,1	300,2 ± 115,9		33,3 ± 4,0	31,2 ± 2,4	
	Biogel 3h	893,7 ± 142,1	484,1 ± 161,0	#	33,4 ± 3,8	33,7 ± 1,6	
	Biogel 24h	1184,2 ± 152,6	482,3 ± 110,3	# *	66,1 ± 15,2	136,1 ± 60,6	&
RANTES	Basal	0,04 ± 0,02	0,02 ±0,01		7,9 ± 0,8	10,9 ± 1,1	
	Biogel 1,5h	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01		9,5 ± 2,1	10,7 ± 2,6	
	Biogel 3h	0,75 ± 0,07	0,2 ±0,1		10,6 ± 2,6	12,5 ± 1,8	
	Biogel 24h	2,92 ± 0,95	7,8 ± 0,4	# &*	13,9 ± 0,1	13,0 ± 0,02	
IL-10	Basal	0,67 ± 0,6	0,02 ± 0,01		10, 2 ± 0,2	10,9 ± 1,4	
	Biogel 1,5h	31,6 ± 9,5	15,6 ± 6,9	#	12,7 ± 2,8	13,2 ± 1,37	
	Biogel 3h	60,0 ± 4,0	18,3 ± 6,9	#	10,3 ± 0,8	15,5 ± 1,5	
	Biogel 24h	29,3 ± 2,3	12,5 ± 1,7	# *	15,3 ± 1,35	14,2 ± 2,69	*

Tabela 8 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da AIR (continuação)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
IL-13	Basal	1,5 ± 0,7	0,4 ± 0,01		110,9 ± 35,5	55,0 ± 2,5	
	Biogel 1,5h	8,4 ± 4,1	0,9 ± 0,3		193,5 ± 64,7	64,7 ± 15,7	
	Biogel 3h	16,9 ± 4,5	8,5 ± 7,8		62,4 ± 15,5	131,7 ± 8,0	
	Biogel 24h	46, 8 ± 5,7	26,1 ± 12,8	#	131,1 ± 9,9	103,1 ± 16,4	
IL-15	Basal	3,3 ± 2,7	0,5 ± 0,01		1139,20 ± 514,9	72,1 ± 10,8	
	Biogel 1,5h	5,4 ± 2,0	1,4 ± 0,7		745,7 ± 365,7	154,4 ± 48,4	
	Biogel 3h	30,5 ± 15,6	5,8 ± 2,0		733,05 ± 338,1	121,9 ±70,6	
	Biogel 24h	52,1 ± 13,2	6,9 ± 5,2	*	448,2 ± 211,9	171,0 ± 46,6	
IL-17	Basal	0,13 ± 0,09	0,04 ± 0,01		27,2 ± 17,3	6,9 ± 3,6	
	Biogel 1,5h	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1		36,3 ± 6,4	10,8 ± 4,6	
	Biogel 3h	1,1 ± 0,06	0,6 ± 0,2		17,2 ± 4,2	59,8 ± 24,7	
	Biogel 24h	4,8 ± 1,0	1,1 ± 0,5	# *	18,4 ± 0,8	34, 1 ± 6,4	
TNF-α	Basal	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2		7,0 ± 1,5	5,0 ± 0,6	
	Biogel 1,5h	6,3 ± 1,9	6,1 ± 4,4		5,0 ± 0,5	9,5 ± 2,6	
	Biogel 3h	22,5 ± 3,9	17,0 ± 0,2		8,9 ± 1,1	10,6 ± 0,2	
	Biogel 24h	91,3 ± 11,0	21,5 ± 5,6	# *	10,8 ± 0,5	11,1 ± 1,6	
VEGF	Basal	2,2 ± 1,4	0,64 ± 0,07		77,1 ± 17,1	71,2 ± 20,3	
	Biogel 1,5h	3,5 ± 0,6	1,9 ± 0,3		82,8 ± 24,2	51,4 ± 10,0	
	Biogel 3h	10,5 ± 2,3	3,3 ± 0,9		54,9 ± 6,8	95,8 ± 14,9	
	Biogel 24h	468,8 ± 53,3	30,5 ± 16,6	# *	121,8 ± 21,3	109,9 ± 24,2	
IL-1α	Basal	1,46 ± 2,8	0,88 ± 0,8		125,3 ± 3,7	112,6 ± 30,3	
	Biogel 1,5h	7,5 ± 3,6	4,1 ± 1,8		84,6 ± 22,7	73,6 ± 7,7	
	Biogel 3h	22,4 ± 2,5	6,4 ± 4,3		82,2 ± 13,0	202,1 ± 60,5	
	Biogel 24h	79,9 ± 16,1	11,3 ± 0,4	#	81,3 ± 5,5	182,7 ± 53,3	

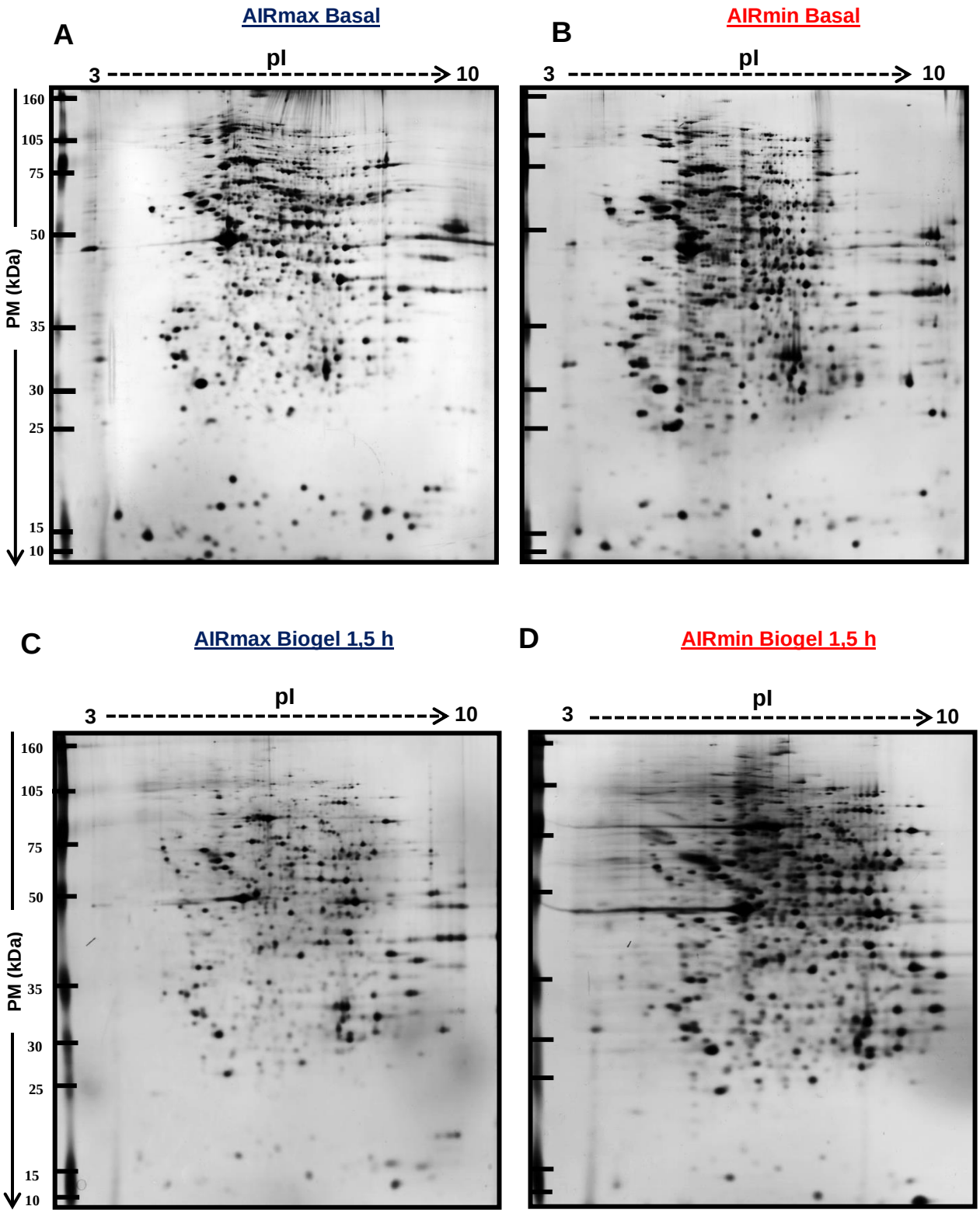
Tabela 2 – Dosagem de citocinas, quimicionas e fatores de crescimento hematopoético no exudato e soro após tempos variados de indução da AIR (conclusão)

Citocina	(AIR)	Exudato			Soro		
		AIRmax	AIRmin	Sig	AIRmax	AIRmin	sig
IL-1β	Basal	2,82 ± 2,8	0,02 ± 0,01		14,7 ± 4,8	14,01 ± 0,01	
	Biogel 1,5h	3,7 ± 1,2	4,5 ± 2,0		21,0 ± 4,8	8,54 ± 1,86	
	Biogel 3h	25,3 ± 4,3	6,2 ± 6,0	&	15,9 ± 4,0	14,7 ± 4,8	
	Biogel 24h	385,7 ± 103,6	38,5 ± 9,1	# *	37,7 ± 7,0	19,6 ± 6,8	

Valores médios expressos em pg/mL ± erro padrão de 3 animais nos grupos basais e biogel 24h e 4 animais nos grupos biogel 1,5h e 3h.
(*) Indica diferença significativa entre AIRmax e AIRmin
(#) Indica diferença significativa entre AIRmax basal e AIRmax tratado com Biogel P-100®
(&) Indica diferença significativa entre AIRmin basal e AIRmin tratado com Biogel P-100®. $p<0,05$
Resultados de 1 experimento.

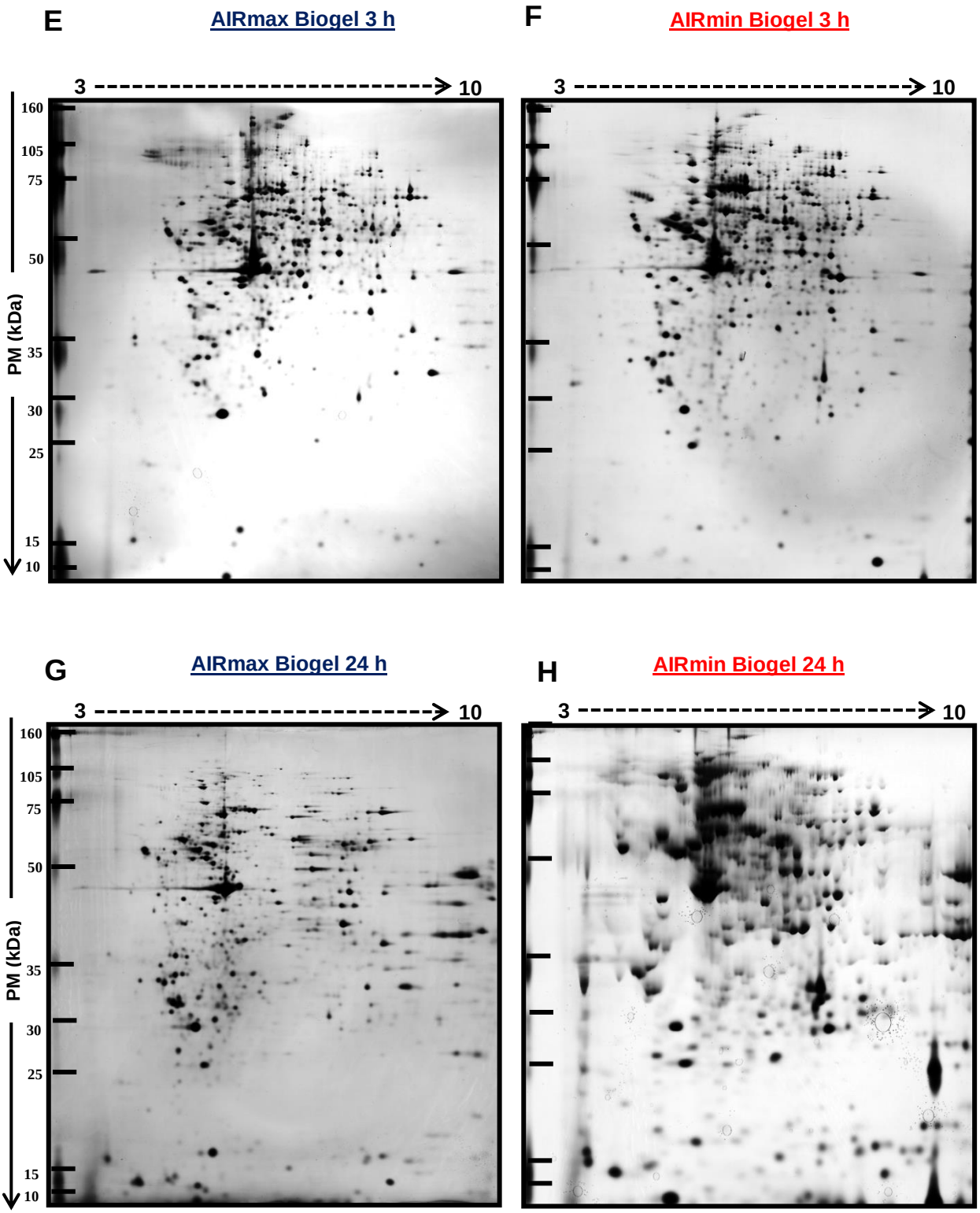
ANEXO B

Eletroforetograma em duas dimensões



Géis em duas dimensões (2D) de 150 µg de proteínas presentes nas células da medula óssea obtidas dos camundongos (A) – AIRmax e (B) – AIRmin em condições basais, (C) AIRmax e (D)- AIRmin após 1,5 h da injeção s.c de Biogel P-100. Géis representativos de 3 experimentos independentes, n=3.

Eletroforetograma em duas dimensões



Géis em duas dimensões (2D) de 150 µg de protéinas presentes nas células da medula óssea obtidas dos camundongos (E) – AIRmax e (F) – AIRmin após 3 h da injeção s.c de Biogel P-100, (G) AIRmax e (H)- AIRmin após 3 h da injeção s.c de Biogel P-100. Géis representativos de 3 experimentos independentes, n=3.