

**Influência da Castração na Mobilização de
Leucócitos induzida pelo Fator Estimulante de
Colônia de Granulócitos (G-CSF) em Ratos**

Rubia Mara Pevidor Pereira de Freitas

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Setembro de 2010

Influência da Castração na Mobilização de Leucócitos Induzida pelo Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF) em Ratos

Rubia Mara Pevidor Pereira de Freitas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 02/09/2010

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Orientador

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Prof^a. Dra. Margareth Ribeiro Moysés

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Setembro de 2010

Freitas, Rubia Mara Pevidor Pereira, 1975

Influência da Castração na Mobilização de Leucócitos induzida pelo Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF) em Ratos.

IX, 62 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2010)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

1. G-CSF 2. Leucócitos 3. Diferenças Sexuais

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:13)

Agradecimentos

Agradeço-te Deus, pois apesar de não merecermos, o Senhor é fiel e ninguém pode impedir os teus desígnios. Agradeço-te pelas vitórias que já estavam garantidas por ti, mas principalmente pelas lutas e dificuldades, pois com as quais aprendemos a reconhecer a nossa fragilidade e o quanto somos dependentes de ti.

Ao meu esposo Paulo e minhas filhas lindas, Paula e Ana Júlia, pelo carinho, compreensão e por todo sacrifício que passaram durante todos esses anos.

Aos meus pais, Nelson e Rosaly, pelo incentivo e apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Mill pela oportunidade e orientações concedidas.

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, por tão gentilmente ter me recebido e ajudado durante toda a realização deste trabalho.

À minha grande amiga Edineuza que sempre esteve ao meu lado, pela amizade sincera e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

Aos colegas do laboratório, Eduardo, Marcelo, Amílcar, Ludimila, Rebeca, Divanei, Elis, Enildo, Marcela e Wellington pela convivência e experiências compartilhadas ao longo deste tempo.

Resumo

Introdução. O fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) é uma citocina hematopoiética capaz de estimular a proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência de células da linhagem granulocítica. Recentemente G-CSF tem sido usado na terapia de várias doenças por sua capacidade de estimular a mobilização de células tronco da medula óssea para tecidos não-hematopoiéticos. Além disso, G-CSF exerce efeitos anti-apoptóticos e pró-angiogênicos. No entanto, poucos estudos relatam a influência de diferenças sexuais sobre os efeitos desta citocina.

Objetivos. Nosso objetivo foi comparar os efeitos de G-CSF sobre a mobilização de leucócitos em ratos machos e fêmeas e investigar a influência da castração neste processo. **Metodologia.** Ratos Wistar machos e fêmeas (12 a 14 semanas de idade) receberam dose única de G-CSF (50µg/kg, sc) ou placebo e a contagem de leucócitos foi realizada antes (basal), 3, 6, 12, 18 e 24h após. Outro grupo recebeu a mesma dose de G-CSF durante sete dias e a contagem foi realizada no mesmo período após a última dose. Para avaliar a resposta ao G-CSF após o infarto do miocárdio, os animais (infartados ou sham) receberam a mesma dose de G-CSF ou placebo trinta minutos após o infarto e a contagem foi realizada 12h após. Para verificar possíveis influências hormonais, machos e fêmeas com 3 semanas de idade foram castrados e após 4 semanas, foram tratados com G-CSF para determinar a cinética da mobilização de leucócitos. **Resultados.** A contagem de leucócitos foi significativamente maior em machos 6, 12, 18 e 24h após dose única de G-CSF, atingindo o pico com 12h. O número de neutrófilos circulantes também foi maior em machos. Após sete doses diárias, a contagem de leucócitos foi maior em machos, 12h após a última dose. Após o infarto do miocárdio, a mesma diferença foi encontrada. Surpreendentemente, nos animais castrados, a contagem de leucócitos também foi maior em machos, 12h após a dose. No entanto, o número de neutrófilos circulantes foi reduzido. **Conclusão:** A mobilização de leucócitos induzida por G-CSF foi maior e mais rápida em machos e a castração não influenciou o dimorfismo sexual observado no efeito desta citocina.

Palavras-chave: G-CSF, leucócitos, diferenças sexuais

Abstract

Background. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a hematopoietic cytokine able to stimulate the proliferation, differentiation, maturation and survival of the cell granulocytic lineage. Recently G-CSF has been used in the therapy of several diseases by its capacity to stimulate the mobilization of bone marrow stem cells to peripheral tissues. Furthermore, G-CSF exerts also anti-apoptotic and pro-angiogenic effects. However, few studies reported the influence of sex differences on the effects of this cytokine. **Aims.** Our purpose was to compare the effects G-CSF dependent leukocyte mobilization on male and female rats and to further investigate the influence of castration on this process. **Methods:** Male and female Wistar rats (12 to 14 weeks old) received single dose of G-CSF (50µg/kg, sc), or vehicle and total leukocyte count was performed before (baseline), 3, 6, 12, 18 and 24h later on. Another group received the same G-CSF dose for 7 days and the count was performed in the same period after the last dose. To evaluate the response to the G-CSF after myocardial infarction, animals (infarcted or sham) received the same dose of G-CSF or vehicle 30 min after acute myocardial infarction and count was performed 12h later. To verify influences of sex hormones, 3 weeks old male and female rats were castrated and 4 weeks later were treated with G-CSF to determine kinetic of leukocyte mobilization. **Results.** The leukocyte count was significantly higher in males 6, 12, 18 and 24h after a single dose of G-CSF, reaching the peak with 12h. The number of circulating neutrophils was also higher in males. After seven daily doses, the count was also higher in males, 12h after the last dose. After myocardial infarction, the same difference was found. Surprisingly, in castrated animals, the leukocyte count was also higher in males, 12h after the dose. However, the count of circulating neutrophils was reduced. **Conclusions.** G-CSF-induced leukocyte mobilization was higher and faster in male rats and castration did not influence the sex dimorphism observed in the effect of this cytokine.

Key words: G-CSF, leukocyte, sex differences

Lista de abreviaturas

CSFs:	Fatores estimulantes de colônias
GCSF:	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF:	Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
GCSFR:	Receptor para o fator estimulante de colônia de granulócitos
SCF:	Fator de célula tronco
IL:	Interleucina
Jak:	Janus quinase
Stat:	Transdutor de sinalização e ativador de transcrição
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno
PI3K:	Fosfatidil inositol 3 quinase
HCP:	Fosfatase de célula hematopoiética
SOCS 3:	Proteína supressora da sinalização de citocinas
IAP:	Proteína inibidora de apoptose
HSC:	Célula tronco hematopoiética
VCAM:	Molécula de adesão da célula vascular
SDF-1:	Fator derivado do estroma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 G-CSF e seu receptor	13
1.2 Regulação da granulopoiese e a homeostase de neutrófilos	16
1.3 Modulação de moléculas de adesão	18
1.4 O papel das proteases	19
1.5 O eixo CXCL12/CXCR4	20
1.6 Dimorfismo de gênero e resposta ao G-CSF	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais experimentais	24
3.2 Protocolos experimentais	24
3.3 Determinação da fase do ciclo estral	26
3.4 Coleta de sangue	27
3.5 Quantificação dos leucócitos totais em câmara de Neubauer	28
3.6 Contagem diferencial de leucócitos	29
3.7 Técnica de produção do infarto do miocárdio	31
3.8 Técnica de castração dos animais	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Curva dose resposta ao G-CSF	33
4.2 Curso temporal da mobilização de leucócitos	34
4.3 Mobilização de leucócitos após o infarto do miocárdio	35
4.4 Parâmetros ponderais	36
4.5 Influência dos hormônios sexuais na mobilização de leucócitos	37

4.6	Mobilização de leucócitos após tratamento prolongado com G-CSF	38
4.7	Mobilização de leucócitos em animais castrados e não castrados	42
5.	DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÃO	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

A hematopoiese consiste na cascata de geração de células maduras do sangue e representa o resultado cumulativo de cascatas de transdução de sinais reguladas intrinsecamente, as quais são mediadas por citocinas e seus respectivos receptores. A integração dessas vias sinalizadoras forma a base de uma geração organizada de diferentes tipos de células.

As células sanguíneas se originam de uma população auto-renovável de células tronco hematopoiéticas multipotentes que se tornam comprometidas com a diferenciação das linhagens eritróide, megacariocítica, granulocítica, monocítica e linfocítica. Contudo, os mecanismos precisos envolvidos na produção coordenada dos diferentes tipos de células sanguíneas e a regulação de eventos cruciais relacionados ao comprometimento com a diferenciação e maturação celular ainda são pouco conhecidos (Rane & Reddy, 2002).

A proliferação e a diferenciação de células hematopoiéticas são controladas por uma família de polipeptídeos solúveis, denominados citocinas, que incluem as interleucinas, os interferons, os fatores estimulantes de colônias e eritropoietina (Metcalf, 1989; Kishimoto et al, 1994).

Durante a divisão celular, as células progenitoras têm a opção de auto-renovação, que é a replicação sem comprometimento para a formação de uma progênie diferenciada. Esta auto-renovação pode ser suprimida e o comprometimento com a diferenciação pode ser induzido por citocinas (Lord et al, 1991).

Uma citocina em particular pode exibir uma ampla variedade de funções biológicas em vários tecidos e células, e várias citocinas diferentes podem exercer efeitos similares e sobrepostos no mesmo tipo de célula (Selvakumaran et al, 1992).

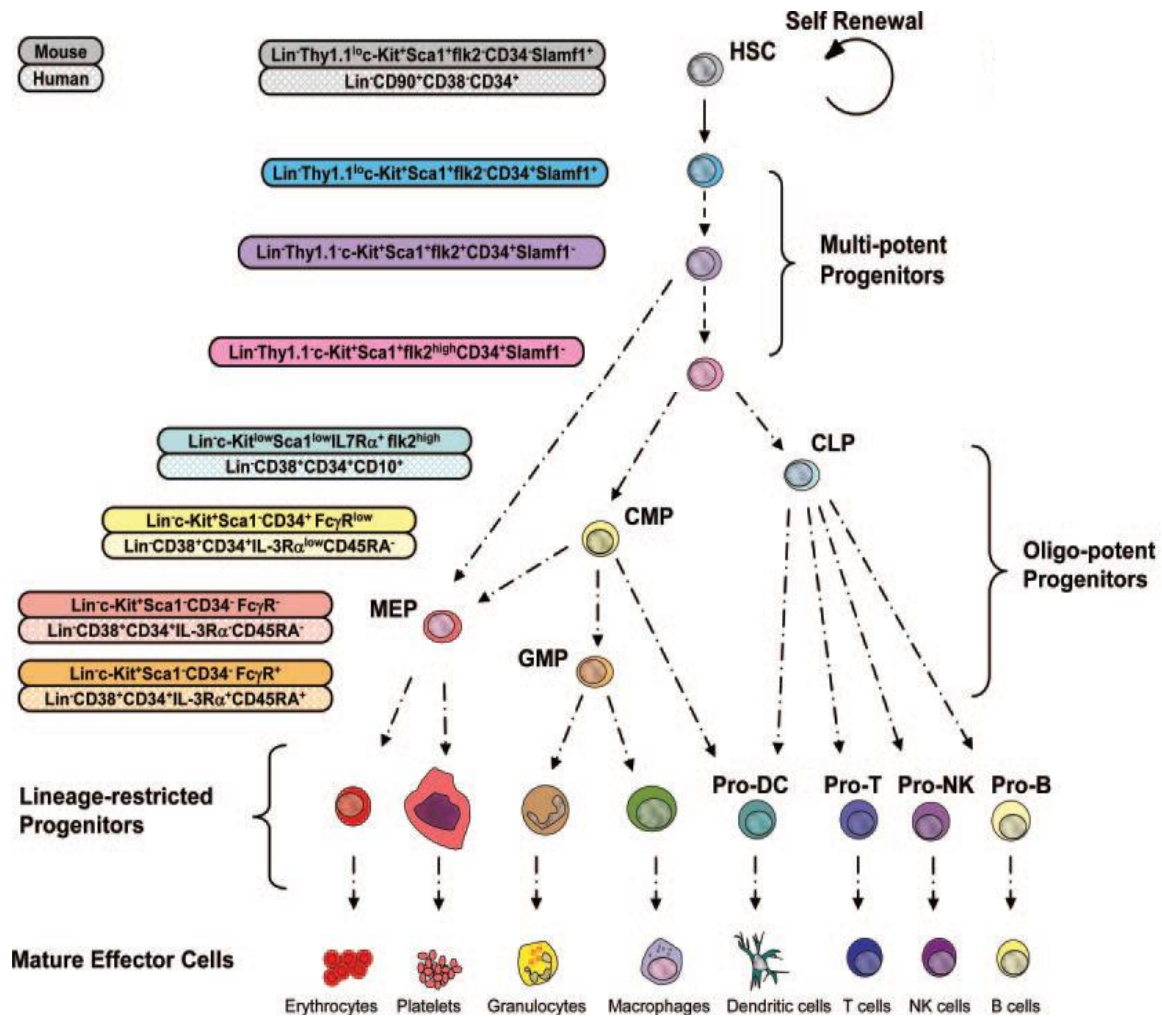


Figura 1. A hierarquia do desenvolvimento hematopoiético (Adaptado de Bryder et al, 2006).

Os fatores estimulantes de colônias (CSFs) são citocinas chave envolvidas na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células progenitoras mielóides, e na ativação funcional de células mielóides maduras (Kleemann, 2008).

A identificação das CSFs foi feita em ensaios de cultura de células progenitoras hematopoiéticas realizados na década de 60 do século passado por Metcalf e colaboradores. Em cultura de células *in vitro* verificou-se que a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas imaturas eram dependentes da presença contínua de fatores humorais, os quais foram coletivamente chamados de “atividade estimulante de colônias” (Demetri & Griffin, 1991).

O fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) foi originalmente identificado por uma atividade específica de induzir diferenciação de células leucêmicas mielomonocíticas (WEHI-3B+) (Nicola et al, 1983). A identificação desta atividade levou à sua purificação e posterior clonagem (Nagata et al, 1986).

O G-CSF é o principal fator de crescimento responsável por regular a granulopoiese, pois estimula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e produz ativação funcional de células da linhagem neutrofílica. O G-CSF recombinante humano tem sido usado para induzir rápida reconstituição hematopoiética e imune após transplante de medula óssea; para mobilização de células tronco/progenitoras da medula óssea no sangue periférico para serem utilizadas no transplante autólogo ou alogeneico; para o tratamento da mielosupressão em casos de leucemia, dentre outras aplicações (Zhang et al, 2009).

O uso clínico do G-CSF tem sido explorado em várias outras doenças, tais como síndromes mielodisplásicas, neutropenia congênita, neutropenia idiopática e neutropenia cíclica. Em cada um destes casos, G-CSF tem sido potente em aumentar a contagem de neutrófilos circulantes (Demetri & Griffin, 1991).

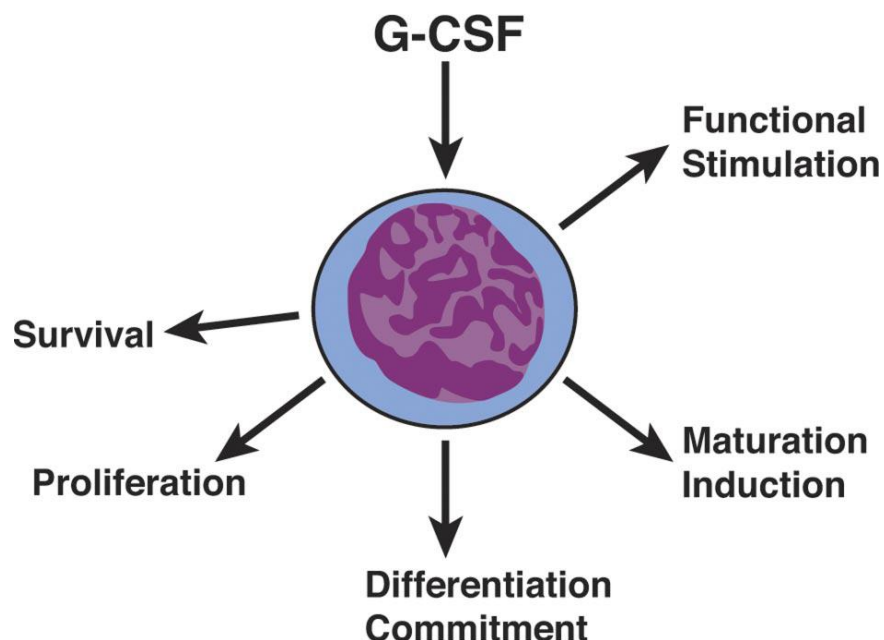


Figura 2. Múltiplas funções de G-CSF na célula mielóide (Metcalf, 2008).

1.1. G-CSF e seu receptor

Células tronco da medula óssea dão origem a neutrófilos maduros seguindo um processo que envolve proliferação e diferenciação ao longo da linhagem granulocítica e maturação terminal (Ogawa, 1993).

Vários fatores de crescimento hematopoiéticos incluindo o fator de células tronco (SCF), interleucina 3 (IL-3), fator estimulante de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), IL-6 e G-CSF têm sido reconhecidos como reguladores positivos da granulopoiese e agem em diferentes estágios do desenvolvimento da célula mielóide (Metcalf, 1989). A maioria dessas citocinas estimula a proliferação de células progenitoras mielóides em estágios precoces do desenvolvimento e tem habilidade limitada para induzir sua diferenciação e maturação (Molineux et al, 1991).

O G-CSF é o único entre os reguladores da granulopoiese que não somente estimula a proliferação, mas também induz a maturação terminal das células progenitoras mielóides em granulócitos neutrofílicos (Avalos, 1996).

G-CSF também exibe atividade hematopoiética sinérgica com outras citocinas *in vitro*. Essa sinergia pode ser particularmente atingida quando G-CSF é usado em combinação com outras citocinas que agem em células progenitoras mais primitivas, tais como IL-3 ou IL-6. Assim, a exposição de células progenitoras à combinação de G-CSF e GM-CSF resulta no aparecimento de mais colônias do que ambos os fatores isoladamente (Demetri & Griffin, 1991).

Dentro das mesmas condições de cultura, tanto IL-3 como GM-CSF sozinhos são capazes de sustentar efetivamente a formação de colônias de neutrófilos. Contudo, G-CSF pode exercer ação sinérgica com ambos, IL-3 e GM-CSF, estimulando a proliferação de células progenitoras nos estágios precoces do desenvolvimento, enquanto G-CSF é um regulador específico da linhagem neutrofílica que estimula potencialmente os estágios terminais do desenvolvimento dos neutrófilos. Embora G-CSF estimule menos intensamente a proliferação de células do que IL-3 ou GM-CSF *in vitro*, estudos *in vivo*, feitos em camundongos, indicam que G-CSF induz maior aumento da contagem de granulócitos no sangue periférico comparado com GM-CSF ou IL-3 (Metcalf et al, 1991).

G-CSF, assim como outros CSFs e ILs, exercem suas atividades biológicas através de ligação de alta afinidade com receptores específicos na superfície das células (Demetri & Griffin, 1991).

O receptor de G-CSF (G-CSFR) é uma proteína do tipo I pertencente à superfamília dos receptores de citocinas. Consiste de uma cadeia polipeptídica única codificada por um único gene no cromossomo 1p35-p34.3 (Barreda et al, 2004).

O G-CSFR é expresso nas células progenitoras pluripotentes, células progenitoras com comprometimento mielóide e células mielóides diferenciadas, desde mieloblastos até neutrófilos maduros. A expressão do G-CSFR não é restrita a células mielóides como originalmente se pensava, embora os efeitos biológicos da expressão de G-CSFR em tecidos não mielóides permaneçam incertos. Vários pesquisadores têm relatado a presença de G-CSFR em subtipos de células linfóides e monócitos, plaquetas, células endoteliais vasculares, placenta humana, células trofoblásticas e, possivelmente, neurônios e células da glia (Anderlini et al, 2008).

O número de G-CSFRs aumenta com a maturação dentro da linhagem mielóide e neutrófilos possuem o maior número. Contudo, neutrófilos ainda expressam um número relativamente baixo de G-CSFRs (aproximadamente 50 a 500 por célula) e acredita-se que somente a minoria destes receptores necessita ser ocupado para obter uma resposta biológica máxima (Avalos, 1996; Anderlini, 2008).

Vias sinalizadoras ativadas através da ligação de G-CSF com seu receptor são bastante complexas e incluem a ativação de Jak/Stat, Ras-Raf-MAPK quinases, PI3-quinase/Akt, Src quinases (lyn e hck) e quinases de tirosina syk-1 (Dong & Lerner, 2000; Rane & Reddy, 2002).

Na via Jak/Stat, o G-CSF induz a fosforilação de Jak1, Jak2 e Tyk2, Stat1, Stat3, Stat5, sendo que Jak1/Stat3 são especificamente fosforiladas por G-CSF devido à sua localização dentro do complexo do receptor ou especificidade do substrato (Numata et al, 2005; Koning et al, 2000). A ativação da Jak (quinase de tirosina da família Janus) permite a fosforilação de tirosinas de Stat (transdutor de sinalização e ativador de transcrição) que posteriormente transloca-se para o núcleo, liga-se a sequências específicas do DNA e estimula a transcrição de genes alvos (Kamezaki et al, 2005).

Outra molécula sinalizadora que é ativada por G-CSF é a fosfatidil inositol-3 quinase (PI3k). Recentemente a proteína quinase de treonina/serina (Akt) tem sido identificada como um alvo da PI3-quinase. A ativação de Akt pelo G-CSF é principalmente mediada por quinases da família Src quinases, através de um mecanismo dependente da PI3-quinase (Dong & Larner, 2000).

Evidências indicam que Akt representa um papel positivo na regulação da sobrevivência da célula. Akt inibe a apoptose através da fosforilação e posterior bloqueio de proteínas pró-apoptóticas (BAD). Além disso, a Akt induz a expressão de moléculas antiapoptóticas da família Bcl-2 e também inibe a atividade da quinase glicogênio sintase 3, que libera um sinal pró-apoptótico (Dery et al, 2003).

O G-CSFR também se acopla a vias que regulam negativamente a sinalização e a indução da granulopoiese, incluindo sinais mediados por fosfatases de tirosina SHP-1 (fosfatase de célula hematopoiética, HCP) e a proteína supressora da sinalização de citocinas 3 (SOCS3). SOCS3 regula a resposta das células mielóides ao G-CSF, inibindo a transdução do sinal da via Jak/Stat (Boyle, 2007). A regulação negativa da sinalização do G-CSFR também é acompanhada pela internalização e degradação do receptor (Panopoulos et al, 2008).

Embora estas cascatas sejam claramente distintas com relação aos seus alvos e seus papéis biológicos na proliferação, diferenciação e sobrevivência induzida por G-CSF, evidências sugerem que elas são interdependentes funcionalmente (Dong & Larner, 2000; Kamezaki et al, 2005).

Raam et al. (2008) mostraram que G-CSF retarda a apoptose de neutrófilos através do controle da atividade de calpaínas. O aumento de cálcio intracelular ativa calpaínas (proteases de cisteína dependentes de cálcio) que representam um papel importante na regulação de apoptose de neutrófilos tanto pela ativação de fatores pró apoptóticos (BAX) como pela degradação de proteínas antiapoptóticas (XIAP proteína inibidora de apoptose). A degradação de XIAP leva a ativação da caspase 3.

Caspases são proteases que executam a clivagem de alvos específicos que incluem proteínas nucleares, estruturas citoplasmáticas e elementos do citoesqueleto. A clivagem destes alvos causa a morte da célula (Maianski et al, 2002).

O G-CSF inibe o aumento de cálcio na célula causando a inibição da ativação de calpaínas, prevenindo a posterior degradação de XIAP e causando o retardo da ativação de caspases 9 e 3 (Raam et al, 2008).

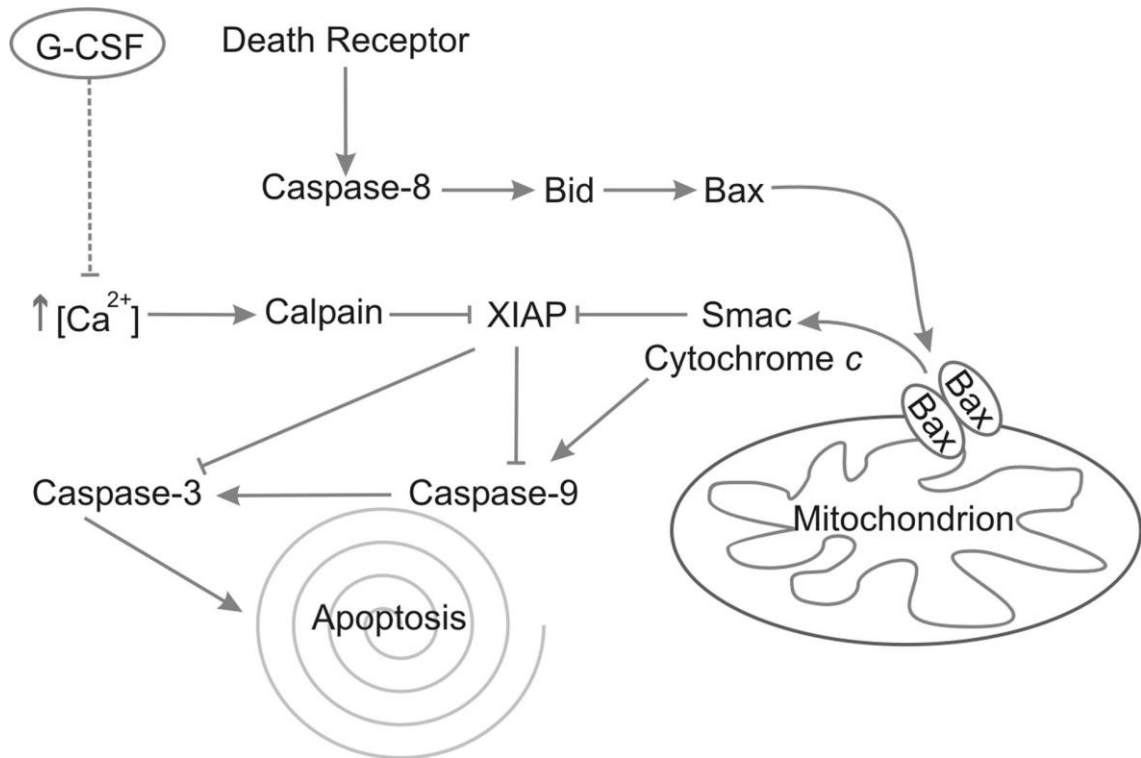


Figura 3. G-CSF regula a apoptose de neutrófilos (Raam et al, 2008).

1.2. Regulação da granulopoiese e a homeostase de neutrófilos

Dentro de condições basais, a grande maioria das células tronco e células progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) residem na medula óssea. Em resposta a injúria ou após a administração de uma ampla escala de agentes farmacológicos, HSPCs são mobilizadas dentro da circulação.

As HSPCs sobrevivem em um microambiente altamente organizado formado por uma população diversificada de células estromais e uma matriz extracelular rica em fibronectina, colágenos e vários proteoglicanos. As HSPCs são especialmente

distribuídas dentro de nichos específicos no microambiente da medula óssea (Papayannopoulou, 2008).

Existem evidências de que osteoblastos representam um papel chave na regulação da função da HSC (célula tronco hematopoiética), e uma fração de HSCs está associada fisicamente com osteoblastos no endóstio da medula óssea, definindo um nicho endosteal de células tronco (Petit et al, 2002).

Kiel et al, (2005) mostraram que uma fração significativa de células tronco hematopoiéticas da medula óssea está associada com células endoteliais sinusoidais sugerindo que também existem nichos endoteliais para HSCs. A interação de HSCs com diferentes tipos de células estromais nos nichos endosteal e endotelial representa um papel importante na regulação do tráfego, auto-renovação, proliferação e diferenciação das HSCs (Blank et al, 2008; Kaplan et al, 2007).

Para entrar na circulação, HSCs migram através da barreira vascular que separa o compartimento hematopoiético da circulação. Os sinusóides venosos são os locais de saída de leucócitos do compartimento hematopoiético e representam a única barreira completa entre a medula óssea e o espaço intravascular (Nervi et al, 2006).

O G-CSF estimula a granulopoiese em vários estágios da diferenciação granulocítica. Ele induz o comprometimento de células progenitoras multipotentes, estimulando a proliferação de precursores granulocíticos e reduz o tempo médio de trânsito através do compartimento granulocítico (Jin et al, 2008). A homeostase de neutrófilos representa um balanço entre a produção, a liberação e a remoção de neutrófilos da circulação. Neutrófilos são produzidos na medula óssea e liberados no sangue periférico através de um processo altamente regulado (Furze et al, 2008).

Em condições estáveis, apenas uma pequena fração do *pool* total de neutrófilos da medula óssea é liberada dentro da circulação, com meia vida de aproximadamente 6-8 h. Em condições de estresse, tais como uma infecção, a contagem de neutrófilos sanguíneos periféricos pode aumentar significativamente (Eash et al, 2009).

O fígado, o baço e a medula óssea são órgãos responsáveis pela remoção de neutrófilos da circulação. Dados recentes sugerem que a sinalização CXCL12/CXCR4 pode contribuir para a remoção de neutrófilos senescentes do sangue. CXCR4 (o receptor de CXCL12) é um regulador chave da homeostase de neutrófilos dentro de condições basais e de estresse (Link et al, 2005). A expressão

de CXCR4 em neutrófilos aumenta com a idade e pode contribuir para o *homing* preferencial de neutrófilos senescentes para a medula óssea. Após a apoptose, a produção de G-CSF é estimulada através da fagocitose de neutrófilos por macrófagos estromais residentes (Furze & Rankin, 2008).

1.2.1. Mobilização das células hematopoiéticas

Embora os mecanismos pelos quais G-CSF induz a mobilização das células hematopoiéticas não são inteiramente entendidos, existem evidências de que três vias gerais estão envolvidas: a atenuação da função das moléculas de adesão, ativação de proteases e a interrupção da sinalização CXCL12/CXCR4 (Papayannopoulou, 2004; Levesque et al, 2007).

1.3. Modulação de moléculas de adesão

A retenção e a liberação de neutrófilos da medula óssea é um processo que permanece incompletamente entendido. Integrinas e selectinas são as principais moléculas de adesão reguladoras do tráfego de neutrófilos. VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$ integrina) e seu ligante VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular) apresentam papel central nas interações das células tronco hematopoiéticas, linfócitos e neutrófilos em desenvolvimento na medula (Link, 2007; Thomas et al, 2002).

VLA-4 tem sido implicada na localização e retenção de células tronco hematopoiéticas através da ligação de VCAM na superfície da célula endotelial e estromal da medula. Neutrófilos da medula são aderidos via VLA-4/VCAM-1, e a inibição de VLA-4 ou VCAM causa liberação de neutrófilos da medula óssea (Smart & Riley, 2008).

Estudos mostram que a mobilização de células tronco hematopoiéticas da medula óssea, mediada por G-CSF, acompanha-se de neutrofilia significativa e é, em parte, mediada por redução da expressão de VCAM, interrompendo assim a adesão de VLA-4 (Smart & Riley, 2008). VLA-4 é expressa em altos níveis durante o

desenvolvimento de neutrófilos de camundongos e humanos e declina com a maturação.

O receptor CXCR4 quando ativado pela ligação de CXCL12 ou SDF-1 (fator derivado do estroma) aumenta a ligação de VLA-4/VCAM-1 nas células hematopoiéticas. Portanto, a retenção e a liberação de neutrófilos da medula óssea podem ser reguladas através de interações entre CXCL12/CXCR4 e VLA-4/VCAM (Petty et al, 2009).

1.4. O papel das proteases

Tem sido proposto que proteases hematopoiéticas representam um papel importante na regulação do tráfego de leucócitos da medula óssea. Enzimas proteolíticas podem degradar a matriz extracelular, clivar moléculas de adesão e influenciar a sinalização através da degradação de receptores e ligantes (Dar et al, 2006; Lapidot & Petit, 2002).

Recentemente, a carboxipeptidase M, uma protease dependente de zinco ligada à membrana que pode degradar CXCL12, foi encontrada sendo expressa em células CD34+ da medula óssea e mobilizadas no sangue periférico e em células mononucleares do sangue periférico. O G-CSF aumentou significativamente a expressão desta protease nessas células, facilitando assim a mobilização de células progenitoras da medula óssea para o sangue periférico (Zhang et al, 2009).

Após a administração de G-CSF, o microambiente da medula óssea é enriquecido com enzimas proteolíticas liberadas por neutrófilos, incluindo metaloproteinases-9 (MMP-9), elastase neutrofílica, e cathepsina G (Kim et al, 2006). Estudos *in vitro* mostram que estas proteases têm a habilidade de clivar várias moléculas de adesão que regulam o tráfego de leucócitos da medula óssea, incluindo c-kit, VCAM-1 e CXCL12 (Petit, 2002). No entanto, estudos *in vivo* revelaram que a inibição combinada de proteases neutrofílicas e metaloproteinases não afetou a mobilização de neutrófilos, sugerindo que estas proteases podem não ser requeridas para o tráfego de neutrófilos da medula óssea (Wengner et al, 2008).

1.5. O Eixo CXCL12/CXCR4

O receptor de quimocina CXCR4 e seu único ligante CXCL12 representam um papel crucial na retenção de células hematopoiéticas dentro da medula óssea e sua mobilização para a circulação periférica. Quimocinas são envolvidas na migração, *homing*, mobilização, proliferação e sobrevivência das células tronco e progenitoras hematopoiéticas (Broxmeyer et al, 2008; Chae et al, 2008).

CXCR4 é amplamente expresso nas células hematopoiéticas, incluindo neutrófilos (Suratt et al, 2004). CXCL12 é uma quimocina produzida constitutivamente por células estromais da medula óssea (Wengner et al, 2008; Jim et al, 2008).

Existem evidências de que a sinalização de CXCL12/CXCR4 pode regular o tráfego de neutrófilos da medula óssea (Rankin et al, 2009). Eash et al, (2009) mostraram que a deleção do gene CXCR4 em células hematopoiéticas de camundongos causa a liberação constitutiva de neutrófilos; e que o tratamento com AMD3100, um antagonista seletivo de CXCR4, estimula a rápida mobilização de neutrófilos em humanos e camundongos. Estes dados sugerem que a alta concentração de CXCL12 na medula óssea estimula a retenção de neutrófilos através do seu receptor.

Estudos mostram que a sinalização CXCL12/CXCR4 pode ser interrompida durante a mobilização de neutrófilos pelo G-CSF. O tratamento diário com G-CSF durante 4-5 dias é associado com neutrofilia acentuada causada tanto pelo aumento da produção quanto pela liberação de neutrófilos (Christopher & Link, 2007). O tratamento com G-CSF induz uma rápida diminuição da expressão de CXCR4 na superfície da célula hematopoiética. Levesque e colaboradores (2007) mostraram que CXCR4 é clivado nas células progenitoras hematopoiéticas durante o tratamento com G-CSF. Além disso, o tratamento diário com G-CSF resulta na diminuição significativa da expressão de CXCL12 e de mRNA para CXCL12 na medula óssea (Christopher et al, 2009). CXCL12 é constitutivamente expresso em altos níveis por osteoblastos da medula óssea. Através de mecanismos ainda não muito claros, o G-CSF potencialmente suprime as células da linhagem osteoblástica, levando a diminuição da expressão de CXCL12 (Nervi et al, 2006).

Estudos em camundongos transgênicos que expressam diferentes mutações no G-CSFR revelam que a magnitude da mobilização de neutrófilos por G-CSF é

fortemente correlacionada com a diminuição da expressão da proteína CXCL12 na medula óssea (Kim et al, 2006).

Apesar da complexidade dos mecanismos envolvidos tanto na retenção como na liberação de células hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico; a interrupção da sinalização CXCL12/CXCR4 representa um papel crucial na mobilização de neutrófilos estimulada por G-CSF.

1.6. Dimorfismo de gênero em resposta ao G-CSF

Alguns estudos realizados em animais e humanos mostram a influência de um dimorfismo de gênero sobre a mobilização de células hematopoiéticas induzida por fatores estimulantes de colônias.

Tanaka & Kaneko, (1991) avaliaram a farmacocinética de G-CSF através de ELISA em ratos machos e fêmeas. Após a administração intravenosa e subcutânea de 5 e 100µg/kg de G-CSF o sangue foi coletado 1, 2, 4 e 8 horas após a administração. A meia vida da droga foi menor em fêmeas comparada a machos. A cultura de células obtidas da medula óssea de machos e fêmeas mostrou o mesmo perfil de dose-resposta ao G-CSF. Estudos *in vivo* revelaram que após a administração de 100µg/kg de G-CSF, não houve diferença na contagem de leucócitos totais e a contagem de neutrófilos foi similar em machos e fêmeas no início (4 h) e no pico da mobilização (12h), porém após 24h a contagem de neutrófilos foi menor em fêmeas.

Moog, (2006) indica o gênero como um dos fatores que podem afetar a mobilização de células tronco da medula óssea para o sangue periférico utilizadas para o transplante autólogo ou alogeneico em humanos.

Um estudo realizado em pacientes com linfoma não-Hodgkin mostrou que a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas estimulada por G-CSF foi menor em mulheres (Micallef et al, 2000).

Fischer et al, (2005) mostraram que após a administração de Filgrastim ou lenograstim, a mobilização de células tronco da medula óssea no sangue periférico foi menor em mulheres. Um estudo realizado por Vasu et al, (2008) mostra que após a administração de G-CSF o número de células CD34⁺ mobilizadas no sangue periférico para o transplante alogeneico também foi menor em doadoras do sexo

feminino. Abdallah, (2008) mostrou em um estudo realizado em crianças com neutropenia citotóxica, que a contagem de neutrófilos foi significativamente influenciada pelo gênero. Neste estudo, após dose única de filgrastim, a contagem de neutrófilos foi maior em meninos.

Gupta & Singh, (2007) mostraram em um estudo realizado em camundongos machos e fêmeas com linfoma de células T, que a habilidade proliferativa de células da medula óssea *in vitro* era dependente do gênero. Células da medula óssea de machos apresentaram maior habilidade proliferativa *in vitro*. Após a incubação de células da medula óssea em meio contendo estrógenos e andrógenos, a habilidade proliferativa aumentou em ambas, sendo significativamente maior em células da medula óssea de machos. Antagonistas de estrógenos e andrógenos adicionados ao meio de cultura tiveram pequeno efeito inibitório sobre a habilidade proliferativa de células da medula óssea de machos e fêmeas, porém ainda assim, a habilidade proliferativa foi maior em células derivadas da medula óssea de machos. Nesse mesmo estudo verificou-se que a expressão gênica do M-CSF também foi maior em células derivadas da medula óssea de machos.

Sabendo da importância clínica e experimental do uso do G-CSF como terapia de várias doenças, seja por seus efeitos sobre a mobilização celular ou regenerativos e/ou de sobrevivência, pouco têm sido explorado sobre a influência de diferenças sexuais nos efeitos desta citocina. Portanto, nós verificamos a influência do gênero sobre a mobilização de leucócitos periféricos estimulada por G-CSF.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos de G-CSF sobre a mobilização de leucócitos em ratos machos e fêmeas.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com G-CSF em machos e fêmeas sobre:

- a mobilização aguda e crônica de leucócitos totais;
- a contagem diferencial de leucócitos;
- a mobilização de leucócitos 12 horas após o infarto agudo do miocárdio;
- a mobilização de leucócitos após a castração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) e receberam água e ração *ad libitum*. As gaiolas foram alojadas em um ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

3.2. Protocolos Experimentais

3.2.1. Curva dose-resposta ao G-CSF

Foram utilizados 40 ratos, sendo 20 machos e 20 fêmeas, com 12 a 14 semanas de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos, dois de machos e dois de fêmeas, cada um recebendo G-CSF ou placebo, respectivamente. Nas fêmeas, a injeção de G-CSF ou placebo era feita na fase de proestro (fase do ciclo estral). Em cada animal foi administrada dose única subcutânea (sc) de 25, 50 ou 100µg/kg de peso corporal de G-CSF recombinante humano (Filgastrim[®], Biosintética, Buenos Aires, Argentina) diluída em salina a 0,9% em proporção de 1:3. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina. Amostras de sangue foram retiradas 12, 18 e 24 horas após a administração da droga ou salina para a contagem total de leucócitos. Cada grupo foi formado por 5 machos e 5 fêmeas e diferentes animais foram usados para testagem de cada dose.

3.2.2. Curso temporal da mobilização de leucócitos

Para determinação da variação temporal de leucócitos no sangue periférico em animais machos e fêmeas após tratamento com G-CSF foi escolhida a dose fixa de 50 ug/kg (sc) pois, no protocolo anterior, esta dose mostrou produzir mobilização máxima aproximadamente 12 horas após o tratamento. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina correspondente ao peso corporal. Foram utilizados 20 ratos, 10 machos e 10 fêmeas. Nestas, a injeção foi feita independente da fase do ciclo estral. De cada animal foi retirado alíquota de sangue periférico na condição basal (antes da injeção de G-CSF ou salina) e 3, 6 e 18 horas

após o tratamento. A injeção de G-CSF foi feita em 6 ratos machos e 6 fêmeas e a solução salina em 4 machos e 4 fêmeas.

3.2.3. Mobilização de leucócitos em ratos machos e fêmeas com infarto do miocárdio.

Neste protocolo foram utilizados 59 animais, sendo 32 machos e 27 fêmeas. O infarto do miocárdio foi realizado por ligadura permanente dos ramos anteriores da artéria coronária esquerda de acordo com técnica descrita adiante. A injeção de dose única de G-CSF (50 ug/kg, sc ou solução salina) era feita 30 minutos após a ligadura coronariana. O grupo controle (sham) foi submetido a uma cirurgia fictícia e 30 minutos após tratado na mesma dose de G-CSF ou salina.

Amostra de sangue para contagem leucocitária foi obtida imediatamente antes da injeção de G-CSF ou salina e 12 horas após.

3.2.4. Influência dos hormônios sexuais na mobilização leucocitária mediada pelo G-CSF.

Tendo em vista que em todos os protocolos anteriores verificava-se menor contagem leucocitária no sangue periférico em fêmeas, foi realizado um protocolo experimental para determinar se tal diferença decorria das diferenças hormonais entre os dois grupos. Para tanto, foram utilizados 38 animais, 20 machos e 18 fêmeas. A castração (ovariectomia e orquiectomia cirúrgica) foi feita nos animais com 21 dias de idade sob anestesia com ketamina + xilazina. Os animais controles foram submetidos a procedimento cirúrgico fictício. Trinta dias após foi feita a injeção em dose única de G-CSF (50 ug/kg, sc) ou salina em ratos machos e fêmeas sem castração. Amostra de sangue foi coletada na condição basal (antes da administração da droga) e 3, 6, 12 e 24 horas após para contagem leucocitária.

A eficácia da castração na redução dos hormônios sexuais foi feita em machos e fêmeas pela pesagem da vesícula seminal, próstata e útero, respectivamente. Após a última coleta de sangue, os animais foram sacrificados com sobredosagem de quetamina + xilazina para remoção do útero e das vesículas seminais. Os órgãos foram dissecados dos tecidos periféricos em placa de Petri, desidratados rapidamente em papel de filtro e pesados.

3.2.5. Mobilização leucocitária após tratamento prolongado com G-CSF

Para determinar se o tratamento mais prolongado com G-CSF mantém a mobilização leucocitária após a injeção desta citocina, foi feito um protocolo específico em ratos machos e fêmeas determinando-se o curso temporal da mobilização de leucócitos para o sangue periférico após injeção de G-CSF. Os animais com 8 semanas de idade (6 machos e 5 fêmeas) receberam tratamento diário com G-CSF (50 ug/kg sc) durante 7 dias. No último dia (7ª dose) foi coletado sangue periférico imediatamente antes da injeção (medida basal) e 3, 6, 12 e 24 horas após o tratamento para a contagem leucocitária.

3.3. Determinação da Fase do Ciclo Estral

As fases do ciclo estral das ratas foram determinadas através de esfregaços vaginais realizados pela manhã e à noite. Com o auxílio de uma ponteira acoplada a um conta-gotas, foram injetados 0,10 ml de solução salina através do canal vaginal. Imediatamente após ser injetado, o fluido vaginal era coletado e colocado sobre uma lâmina de vidro para confecção do esfregaço vaginal. Os esfregaços foram analisados a fresco em microscópio ótico (aumento de 400x). As diferentes fases do ciclo estral foram identificadas através da visualização dos tipos celulares característicos de cada fase, como mostra a figura 4

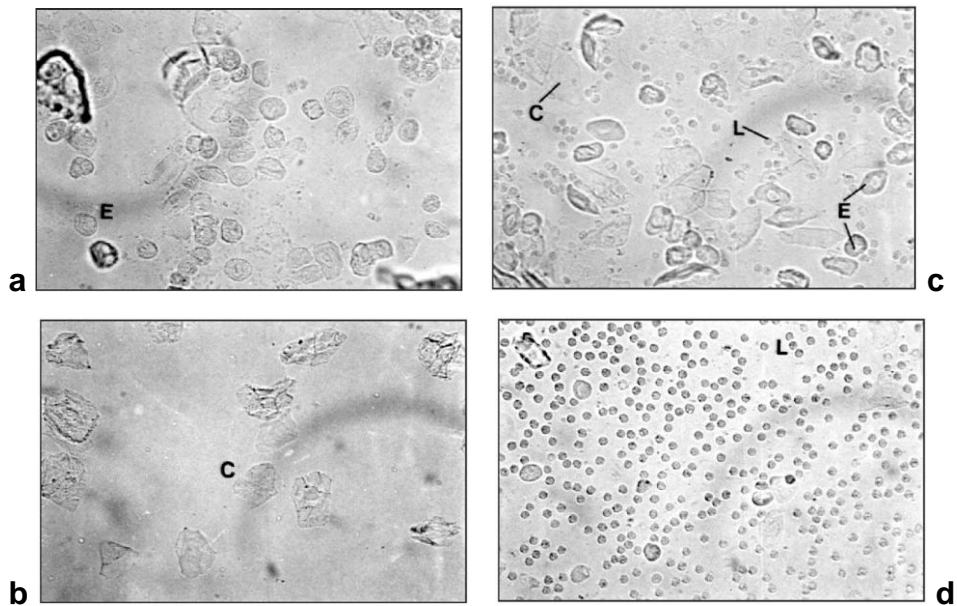


Figura 4. Fotomicrografias de esfregaços vaginais não-corados mostram as quatro fases do ciclo estral. Leucócitos (L), células epiteliais (E), células cornificadas (C). A fase do proestro (a) é caracterizada pela presença predominante de células epiteliais nucleadas. O estro (b) predominam células cornificadas ou queratinizadas anucleadas. O metaestro (c) consiste da mesma proporção entre células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos. O diestro (d) consiste principalmente da predominância de leucócitos. (Adaptado de Marcondes, 2002).

3.4. Coleta de Sangue

Os animais foram contidos e uma das patas traseiras (direita ou esquerda) foi imobilizada. Após a tricotomia local, a veia safena lateral foi puncionada com uma agulha 13 x 4.5 (BD, Brasil) e 20 μ l de sangue foi coletado com uma pipeta automática. A amostra foi imediatamente transferida para tubo Eppendorf contendo 380 μ l solução de ácido acético a 2% para lise das hemácias (proporção de diluição 1/20). Após a homogeneização, foi colocada uma alíquota dessa suspensão em uma câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer permaneceu por 5 minutos dentro de uma placa de Petri invertida, contendo um chumaço de algodão úmido, permitindo assim a sedimentação das células. A contagem dos leucócitos totais foi realizada em microscópio ótico sob aumento de 400 X.

No protocolo de infarto do miocárdio, os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de quetamina (5mg/kg) e xilazina (10mg/kg) 12 horas após a ligadura

coronarina ou cirurgia fictícia. Uma alíquota de 3 ml de sangue foi coletada por punção cardíaca e colocada em tubo de vidro contendo anticoagulante EDTA na proporção de 1 mg/ml. Após homogeneização foi realizada a contagem das células (hemograma) em sistema automático.

3.5. Quantificação dos Leucócitos Totais em Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer (figura 5) é um tipo de lâmina de microscópio de vidro espesso, composta por dois retículos na região central separados por um sulco transversal. A região reticular (quadriculada) é dividida em nove quadrantes, cada qual de dimensão 1x1mm e 0,1mm de profundidade. Cada quadrante é composto por dezesseis quadrados menores. A câmara é limitada superiormente por uma lamínula específica, que confere um volume de $0,1\text{mm}^3$ ou 1×10^{-4} ml a cada quadrante ($1 \times 1 \times 0,1 = 0,1\text{mm}^3$). A contagem total do número de leucócitos é realizada nos quatro quadrantes externos (localizados em cada extremidade) da câmara e o cálculo da contagem das células é feita pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células} \times 10^4 \times 1 (\text{volume}) \times 20 (\text{Fator de diluição})}{8 (\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes})}$$

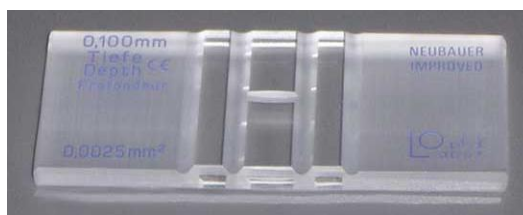


Figura 5 - Câmara de Neubauer.

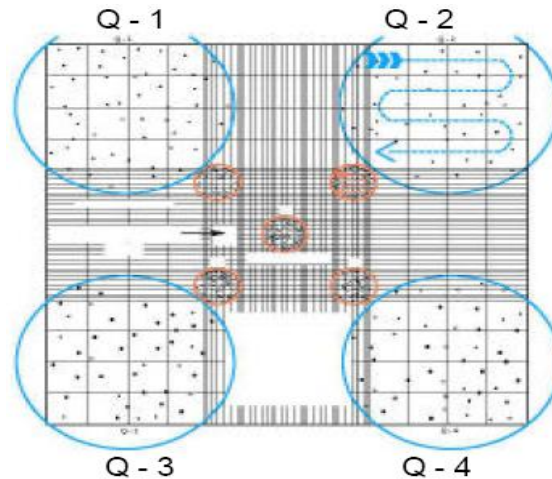


Figura 6. Esquema e sentido da contagem de células na câmara de Neubauer

Para uniformizar as quantificações, foram contadas apenas as células que estavam posicionadas em cima dos limites superior e esquerdo do quadrante (figura 6).

3.6. Contagem diferencial de leucócitos

A contagem dos subtipos de leucócitos foi feita em esfregaços sanguíneos corados (Fig. 8). A preparação do esfregaço foi feita da em lâmina de vidro previamente limpa e seca. Uma gota de sangue era colocada a, aproximadamente, um centímetro de uma das extremidades da lâmina. Uma segunda lâmina (extensora) de bordos esmerilados era aproximada da gota de sangue em ângulo de 45° e deslizada ao longo da primeira em um movimento rápido e homogêneo, permitindo que o sangue fosse espalhado horizontalmente no bordo da lâmina formando uma fina camada uniforme.

Para a identificação dos diferentes tipos de células sanguíneas (glóbulos brancos), foi realizada a coloração padrão descrita abaixo. Após secar o esfregaço agitando a lâmina no ar, a coloração foi realizada imediatamente. Depois de posicionada em um suporte adequado, o esfregaço foi recoberto com 20 gotas do corante May-Grünwald (Bioclin). Após 3 minutos foram acrescentadas 20 gotas de tampão fosfato (pH = 7,2) e a solução foi misturada nos diversos pontos da lâmina. Depois de 2 minutos a mistura foi desprezada e, sem lavar a lâmina, foram acrescentadas 20 gotas da solução diluída de Giemsa (Bioclin), preparada no momento da coloração (uma gota de Giemsa para cada mililitro de água destilada). Após 12 minutos o corante foi desprezado e a lâmina lavada em água corrente. Depois de secar em posição

vertical, a qualidade da lâmina foi avaliada com uma objetiva de menor aumento (10x e 40x) em um microscópio ótico. Em seguida, foi analisada com objetiva de imersão de maior aumento (10x 100x) para a identificação dos vários tipos de glóbulos brancos. A contagem diferencial dos leucócitos foi iniciada no meio em direção ao final da lâmina (zona mais uniforme). Foram contadas 200 células, percorrendo a lâmina em ziguezague de uma borda a outra, como mostra a figura 7. Os resultados foram expressos em % do total de leucócitos contados.

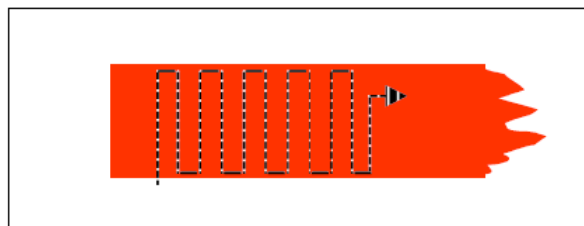


Figura 7. Esquema do procedimento da contagem diferencial de leucócitos.

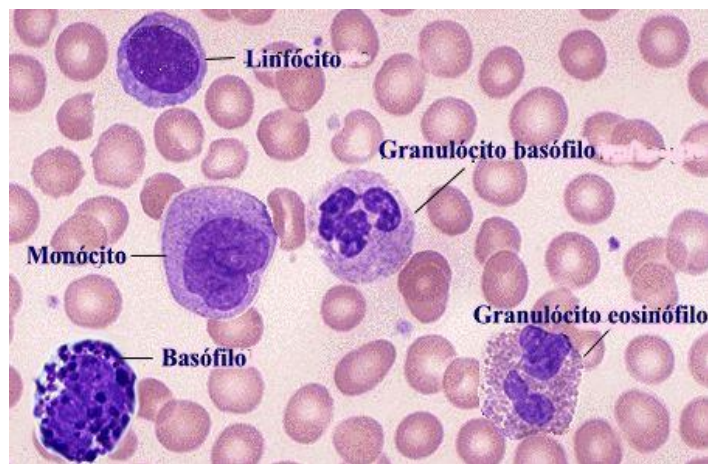


Figura 8. Figura representativa mostra os subtipos de leucócitos: linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

3.7. Produção do Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio foi produzido de acordo com a técnica padrão em nosso laboratório (Mill et al., 1990). Após anestesia com ketamina (5mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intramuscular, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica para animais em decúbito dorsal. Foi realizada toracotomia no nível do 4^o espaço intercostal esquerdo, e o coração era rapidamente exteriorizado. Com um fio de mononylon 6.0 (Medline, Brasil) acoplado a uma agulha não traumática, foi realizada a oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda, localizada logo abaixo da borda do átrio esquerdo. O coração foi reposicionado e o tórax imediatamente fechado com uma sutura em forma de bolsa. A presença de infarto era confirmada 24 horas após através do registro do eletrocardiograma. Foram considerados infartados os animais com presença de onda Q patológica na derivação D1, conforme padronização do laboratório.

3.8. Técnica de Castração (Ooforectomia e Orquiectomia)

Ratos machos e fêmeas foram submetidos à anestesia geral com cloridrato de ketamina (5mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intramuscular. As fêmeas foram colocadas em decúbito ventral e, após tricotomia local, foram realizadas incisões laterais de aproximadamente 0,5 cm na pele e na camada muscular, entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana. Após a abertura da cavidade peritoneal, foi realizada a ligadura das tubas uterinas e os ovários foram removidos (ooforectomia bilateral). Em seguida foi realizada a sutura da musculatura e pele. Os machos foram colocados em posição supina e, em seguida, foram submetidos a uma incisão de 1 cm na bolsa escrotal até atingir a *tunica vaginalis*. Os testículos foram expostos por compressão e uma ligadura foi feita em volta do cordão espermático. Em seguida os testículos foram seccionados (orquiectomia bilateral) e a bolsa escrotal foi suturada.

3.9. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (epm). A comparação de duas médias foi feita por teste t de Student e a comparação de mais de duas médias foi feita por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tuckey quando pertinente. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa GB-STAT v 9.0. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software OriginPro versão 7.5.

4. RESULTADOS

4.1. Curva dose-resposta ao G-CSF

Para a escolha da dose ideal para recrutar o maior número de leucócitos, foram testadas três diferentes doses. A contagem de leucócitos realizada antes da administração da droga ou salina (contagem basal) foi similar em machos e fêmeas com tendência a valores maiores (cerca de 20%) em machos do que em fêmeas (10315 ± 612 vs 8882 ± 532 leucócitos/ mm^3 , respectivamente). A concentração de leucócitos no sangue periférico 12 horas após a injeção de G-CSF foi similar nas doses de 25, 50, e $100\mu\text{g}/\text{kg}$ tanto em machos como em fêmeas, sendo que para cada dose administrada a concentração leucocitária foi sempre maior ($p < 0.05$) em machos do que em fêmeas (figura 9). A mobilização leucocitária em machos também foi maior em termos relativos. Assim, considerando os dados observados após a injeção da dose intermediária de G-CSF ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$) ocorreu aumento de cerca de 290% da concentração leucocitária em machos e de 240% em fêmeas. A injeção de solução salina não produziu qualquer modificação significativa na contagem leucocitária.

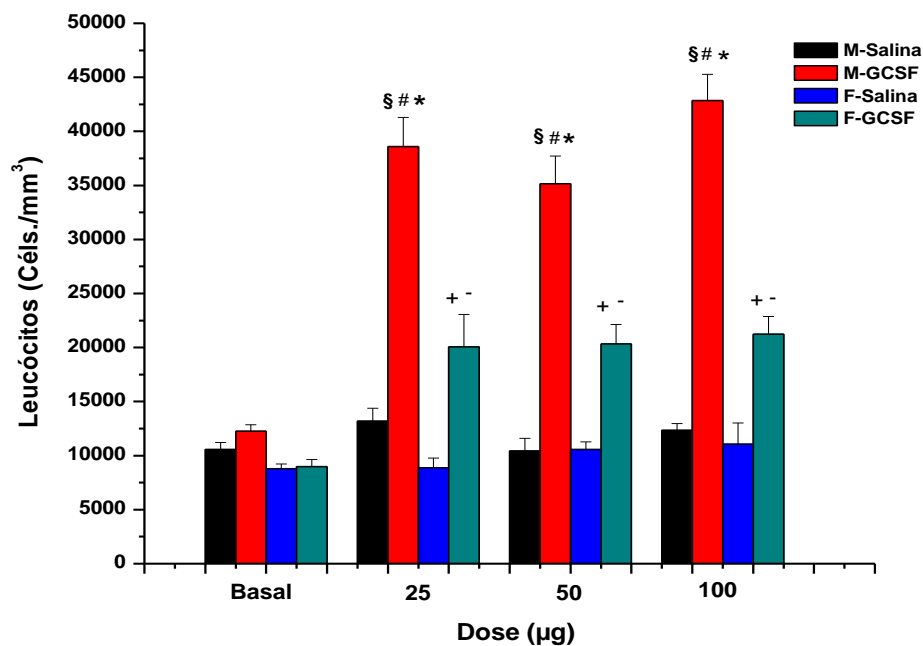


Figura 9. Leucócitos 12 horas após a administração de dose única de 25, 50 e $100\mu\text{g}/\text{kg}$ de G-CSF ou volume equivalente de salina. Machos (M) e Fêmeas (F). [§] $p < 0,05$ vs. M-basal, [#] $p < 0,05$ vs. M-

salina, * $p < 0,05$ vs. F-G-CSF, $\bar{p} < 0,05$ vs F-basal, $^+p < 0,05$ vs. F-salina (n=5 animais/grupo). Os valores representam a média \pm epm

4.2. Curso temporal da mobilização de leucócitos

Tendo em vista o resultado do protocolo anterior, foi escolhida a dose de 50 ug/kg de G-CSF para se determinar o curso temporal da mobilização de leucócitos em ratos machos e fêmeas. A contagem leucocitária realizada antes do tratamento com G-CSF (contagem basal) foi similar entre os grupos. Embora sem significância, a contagem basal de leucócitos foi novamente um pouco maior em machos do que em fêmeas. Tanto em machos como em fêmeas observou-se incremento significativo da concentração de leucócitos no sangue periférico. Em ambos os sexos o efeito máximo do G-CSF foi observado no sangue coletado 12 horas após a administração da droga, sendo que nesse momento a concentração leucocitária em machos era cerca de 35 mil/mm³ e em fêmeas de 20 mil/mm³ ($p < 0,05$). A figura 10 mostra claramente que a mobilização parece ser também mais rápida em machos, pois 3 horas após a injeção do G-CSF já se observava aumento significativo da contagem leucocitária em machos de modo diferente da observação em fêmeas. Os dados também sugerem que a queda da mobilização também é mais lenta em machos, pois 24 horas após a injeção do G-CSF a contagem leucocitária em fêmeas já era similar à contagem basal, enquanto que em machos ainda se observava maior concentração de leucócitos. Nos diversos momentos de coleta de sangue, a contagem foi sempre menor em fêmeas do que em machos: 6h (76%), 12h (75%), 18h (53%) e 24h (100%). ($p < 0,05$).

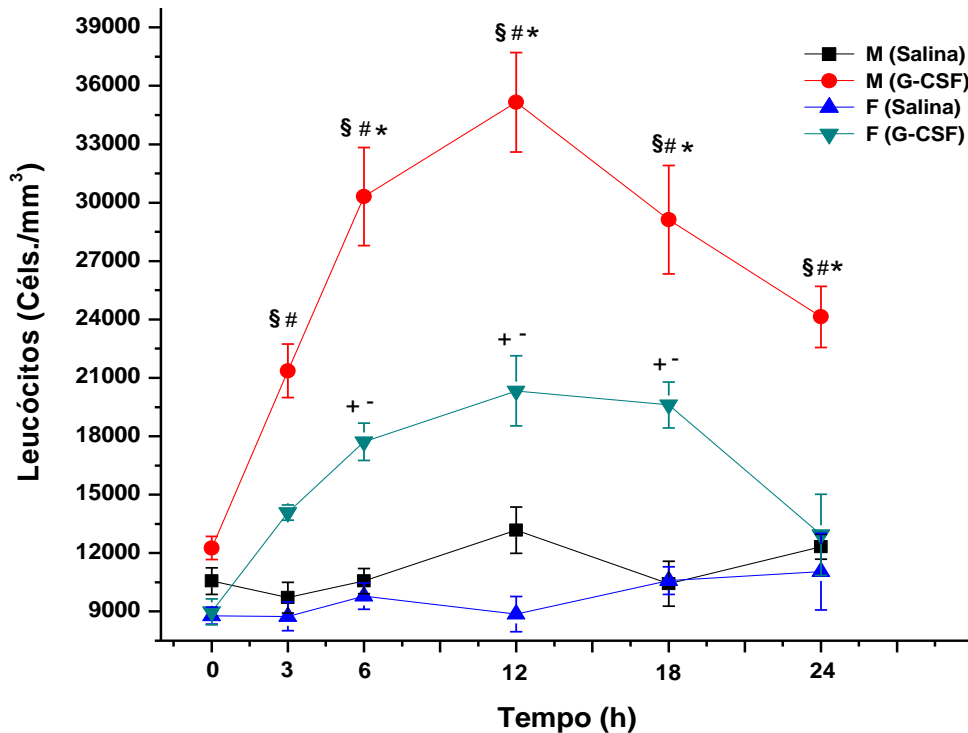


Figura 10. Leucócitos totais antes (tempo 0 = basal) e 3, 6, 12, 18 e 24 horas após a administração de dose única de 50µg/kg de G-CSF ou salina em ratos machos (M) e fêmeas (F). § $p < 0,05$ vs. M-basal, # $p < 0,05$ vs. M-salina, * $p < 0,05$ vs. F-GCSF, - $p < 0,05$ vs. F-basal, + $p < 0,05$ vs. F-salina (n=5-6 animais/grupo). Os valores representam a média±epm.

4.3. Mobilização de Leucócitos em ratos machos e fêmeas com infarto do miocárdio

A contagem de leucócitos totais realizada antes do procedimento cirúrgico não diferiu significativamente entre os grupos, apesar de ter sido maior em machos, como nos protocolos anteriores (figura 11). Interessante observar que a simples cirurgia de simulação de infarto (grupos sham) determinou pequeno incremento na contagem leucocitária tanto em machos como em fêmeas. Ocorreu elevação significativa e similar aos protocolos anteriores na contagem leucocitária após o tratamento com G-CSF em machos submetidos ao infarto do miocárdio ou à cirurgia fictícia, ou seja, a presença do infarto não modificou o efeito do G-CSF ($p < 0,05$). Em fêmeas submetidas aos mesmos procedimentos a elevação da contagem leucocitária foi pequena e não foi significativa. A contagem de leucócitos 12 h após o tratamento com G-CSF foi 65% maior em machos do que em fêmeas ($p < 0,05$).

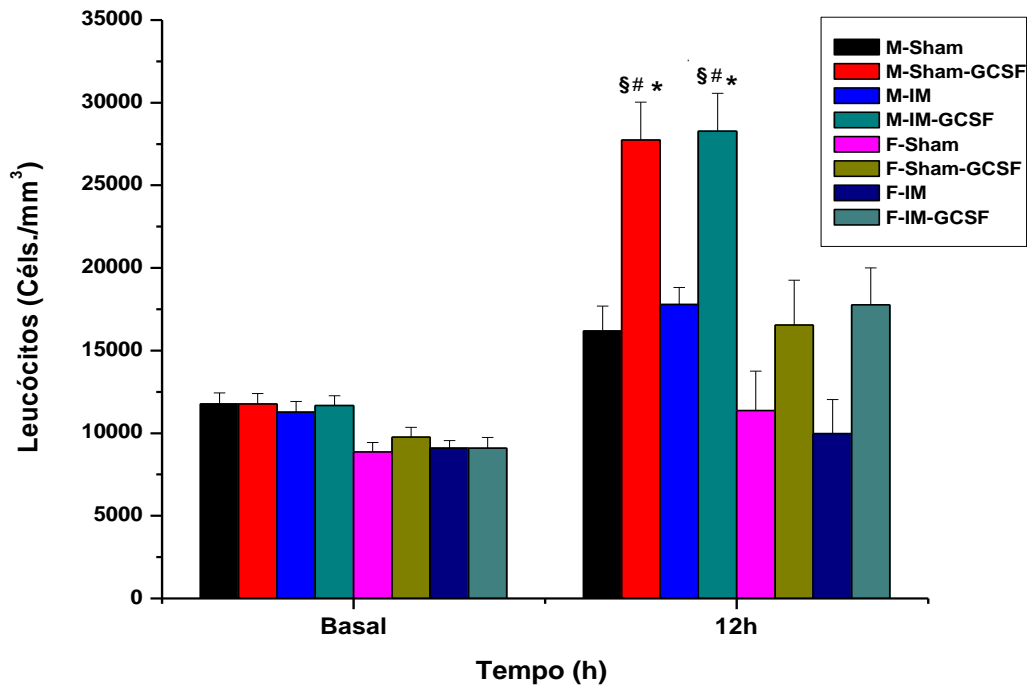


Figura 11. Leucócitos totais antes (basal) e 12h após o infarto do miocárdio (M) ou cirurgia fictícia (sham) em ratos machos (M) e fêmeas (F). [§] $p < 0,05$ vs. M-basal (n=9), [#] $p < 0,05$ vs. M-salina (n=10), ^{*} $p < 0,05$ vs. F-GCSF (N=7). Os valores representam a média \pm epm.

4.4. Parâmetros ponderais

As tabelas 1 e 2 mostram os valores de peso uterino e vesícula seminal de ratos machos e fêmeas castrados e não-castrados. A redução do peso dos órgãos confirma a eficácia da castração dos animais.

Tabela 1. Valores de peso uterino (p.u) e peso corporal (p.c) de fêmeas castradas e não-castradas.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso uterino (mg)	relação p.u (mg)/p.c (g)
Controle (n=5)	178 \pm 5	353 \pm 0	1,98
Castrada (n=5)	188 \pm 10	46 \pm 0*	0,24

Valores expressos como média \pm EPM. ^{*} $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Tabela 2. Valores de peso de vesícula seminal (p.v) e peso corporal (p.c) de machos castrados e não-castrados.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso v. seminal (mg)	relação p.vs (mg)/p.c
Controle (n=5)	251±10	392±0	1,56
Castrado (n=5)	228±10	19±0*	0,08

Valores expressos como média e \pm EPM. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

4.5. Influência dos hormônios sexuais na mobilização leucocitária mediada pelo G-CSF

Para determinar se as diferenças apontadas nas figuras 9 e 10 eram decorrentes dos diferentes perfis hormonais em ratos machos e fêmeas, o mesmo protocolo foi repetido trinta dias após a castração dos animais. A castração foi feita nos animais com 3 semanas de vida e os experimentos foram realizados 4 semanas após. Novamente, a contagem basal não diferiu entre os grupos. Em machos castrados tratados com G-CSF houve incremento do número de leucócitos 6 horas após a droga, tendo atingido o pico leucocitário 12 horas após, comparado ao grupo controle. Após 24 horas o número de leucócitos ainda não tinha retornado ao nível basal. Em fêmeas castradas tratadas com G-CSF houve incremento no número de leucócitos, 12 horas após a droga, comparado ao grupo que recebeu solução salina. Após 24h o número de leucócitos retornou ao nível basal. A contagem leucocitária foi 65% maior em machos castrados comparada a fêmeas castradas, 12 horas após a injeção de G-CSF (Fig.12).

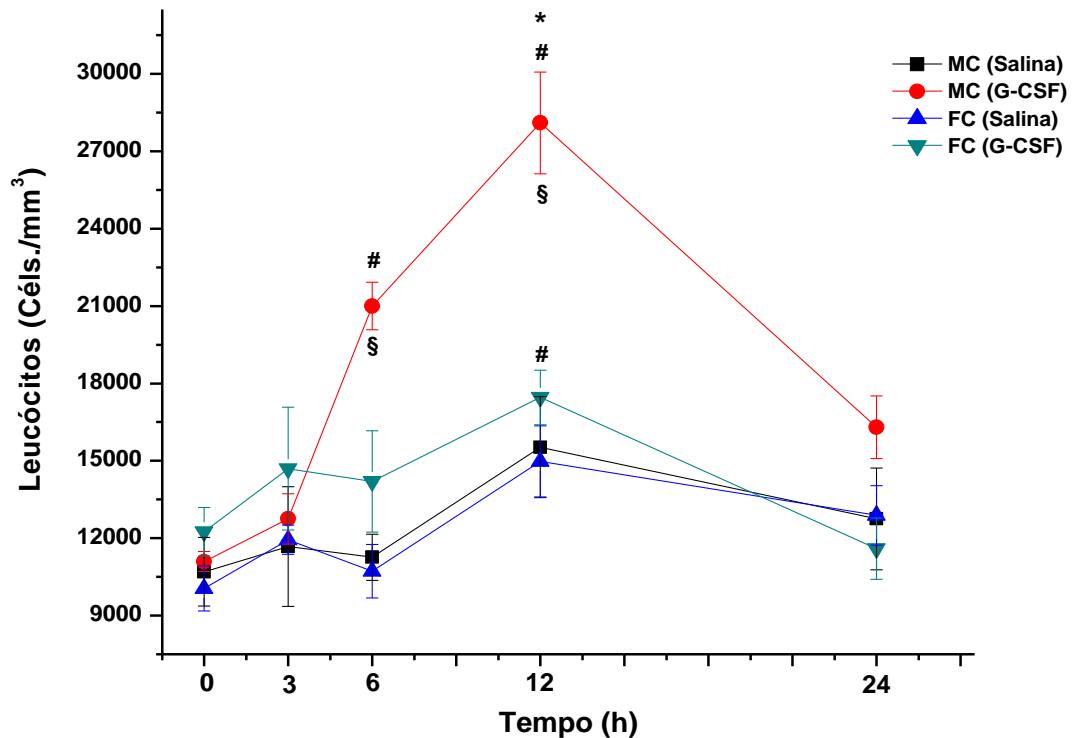


Figura 12. Leucócitos antes (basal), 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de 50µg/kg/G-CSF, em ratos castrados. § $p < 0,05$ vs. M-basal, # $p < 0,05$ vs. M-controle, * $p < 0,05$ vs. F-GCSF, # $p < 0,05$ vs. F-controle (N=5 animais/grupo). Os valores representam a média±epm.

4.6. Mobilização leucocitária após tratamento prolongado com G-CSF

Visando determinar se a administração de doses repetidas de G-CSF alteraria o perfil de mobilização leucocitária, foi realizado protocolo de tratamento por 7 dias, com injeções diárias de dose única de G-CSF em ratos machos e fêmeas. No sétimo dia de tratamento foi feita a contagem de leucócitos antes da última dose (sétima) e 3, 6, 12 e 24 horas após. Os resultados da contagem leucocitária são mostrados na figura 13. Observa-se que a contagem basal foi maior em machos do que em fêmeas, confirmando os achados anteriores (figuras 10) e que o retorno aos níveis basais de leucócitos é mais rápido em fêmeas, após pulsoterapia com o G-CSF. Em machos, a contagem leucocitária apresentou aumento significativo 3 h após a última dose, com 6h houve queda, atingindo-se novamente o pico leucocitário 12 h após a

injeção e retorno aos níveis basais 24 horas após. Embora não tenha sido significativa, o número de leucócitos em fêmeas aumentou 3h após a última dose, com 6h houve queda e 12h após, a contagem de leucócitos apresentou incremento ($p<0,05$). A contagem leucocitária foi 48% maior em machos do que em fêmeas, 12h após a última dose.

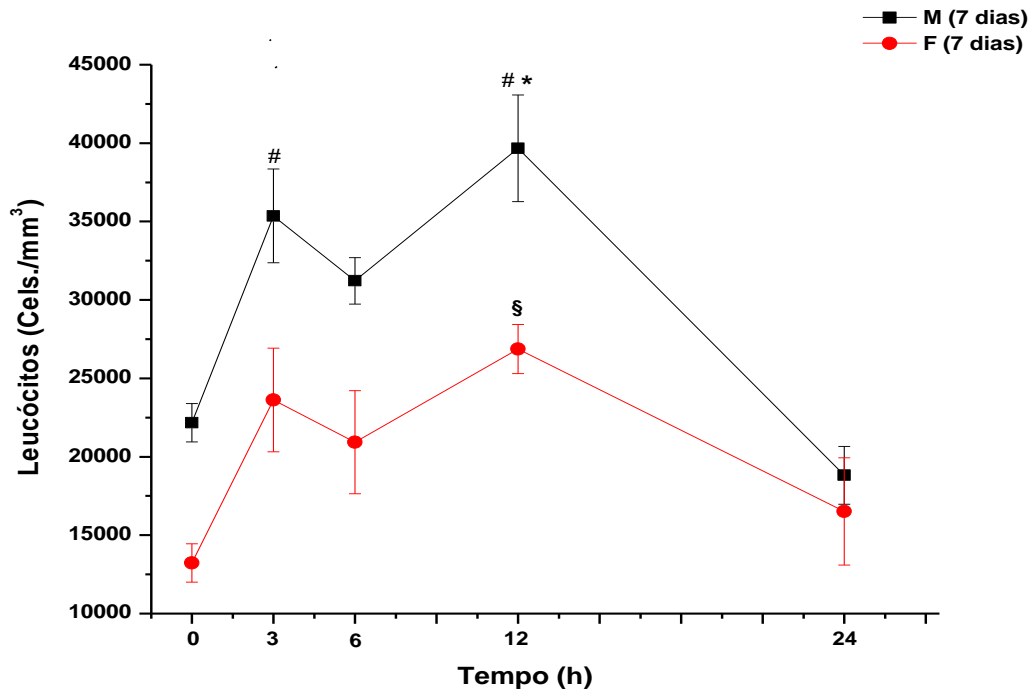


Figura 13. Leucócitos totais após sete dias de administração de G-CSF. [#] $p<0,05$ vs. M-basal, ^{*} $p<0,05$ vs. F-GCSF, [§] $p<0,05$ vs. F-basal ($n=6$ animais/grupo). Os valores estão apresentados como média \pm epm 3, 6, 12 e 24 h após G-CSF injetado em ratos machos e fêmeas.

4.6.1 Mobilização leucocitária em ratos machos e fêmeas no 1^o e 7^o dia de tratamento com G-CSF

A figura 14 mostra a comparação do curso temporal da mobilização leucocitária em ratos machos após a 1^a e a 7^a dose de G-CSF. Houve incremento da contagem leucocitária 6h e 12h após a primeira dose ($p<0,05$). Houve elevação na contagem de leucócitos realizada antes da última dose, porém não foi significativa. Após sete doses diárias, houve aumento na contagem de leucócitos 3h após a última dose, com 6h o número de leucócitos caiu e 12h depois atingiu o pico leucocitário com

43% de aumento em relação à primeira dose ($p<0,05$). Com 24h retornou próximo ao nível basal. Os resultados mostram que a capacidade de mobilizar leucócitos para o sangue periférico permanece praticamente inalterada após administrações repetidas de G-CSF. O mesmo perfil de resultados foi observado dentro do grupo de fêmeas tratadas durante o mesmo período de 7 dias (figura 15).

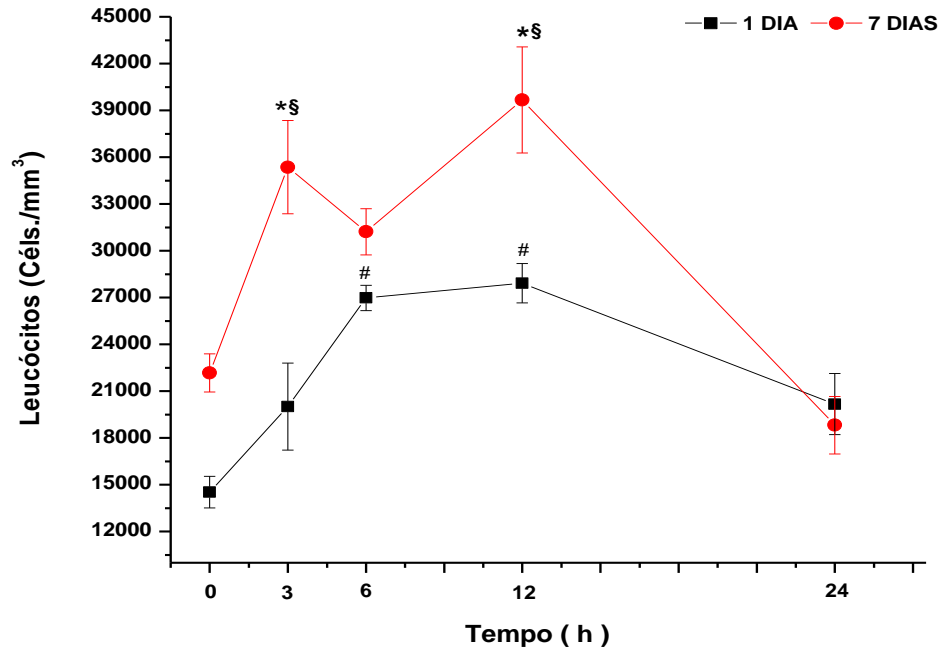


Figura 14. Leucócitos totais em machos no 1^o e no 7^o dia de administração do G-CSF. # $p<0,05$ vs M-basal (1^odia), § $p<0,05$ vs M-basal (7^odia), * $p<0,05$ vs M-GCSF (1^odia). Os valores estão apresentados como média±pm.

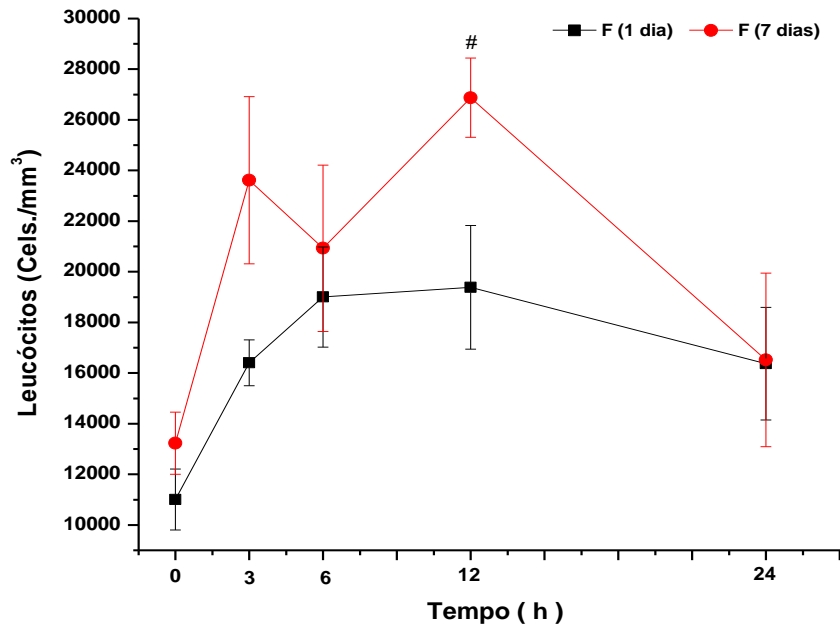


Figura 15. Leucócitos em fêmeas no 1^o e no 7^o dia de administração de G-CSF. #*p*<0,05 vs. F-basal (7^o dia). Os valores estão apresentados como média±epm.

As tabelas 3 e 4 mostram os valores da contagem diferencial de leucócitos, em machos e fêmeas, placebo e tratados (12h após o tratamento com G-CSF). A contagem de neutrófilos circulantes foi maior em machos comparado a fêmeas, tanto após dose única quanto após a sétima dose de G-CSF.

Tabela 3. Contagem diferencial de células sanguíneas periféricas de machos e fêmeas, 12h após dose única de G-CSF ou salina.

Parâmetros	F placebo	F G-CSF	M placebo	M G-CSF
Leucócitos	12658±919	19375±3148 [#]	14200±1351	27921±1270 ^{#*}
Neutrófilos	3724±208	11976±2105 [#]	3568±191	20257±1017 ^{#*}
% L. totais	29±0,9	62±5,1	25±2,2	72,6±1,7
Linfócitos	8652±644	7112±1439	10296±1387	7174±495
% L. totais	68±0,2	36±4,9	72±3,0	25±1,36
Monócitos	282±128	286±55,1	336±85,7	576±148
% L. totais	2,2±0,8	1,5±0,2	2,5±0,8	4,25±2,2

Valores expressos como média±EPM. #*p*<0,05 vs.placebo. **p*<0,05 vs.fêmeas

Tabela 4. Contagem diferencial de células sanguíneas periféricas de machos e fêmeas 12h após dose única e 12h após tratamento prolongado com G-CSF

Parâmetros	F (1 ^a dose)	F (7 ^a dose)	M (1 ^a dose)	M (7 ^a dose)
Leucócitos	19375±3148	26875±1567*	27921±1270*	39667±3405 [#] *
Neutrófilos	11976±2105	13732±1840	20257±1017*	31642 ±3305 [#] *
% L. totais	62±5,1	50±4,1	72,6±1,7	79±2,4
Linfócitos	7112±1439	12768±563	7174±495	7617±856
% L. totais	36±4,9	48±4,1	25±1,36	20±2,2
Monócitos	286±55,1	375±49,6	576±148	406±106
% L. totais	1,5±0,2	1,4±0,1	4,25±2,2	1,0±0,2

Valores expressos como média±EPM. # $p<0,05$ vs.dose única. * $p<0,05$ vs.fêmeas

4.7. Curso temporal da mobilização leucocitária após G-CSF em animais castrados e não-castrados

A figura 16 mostra o curso temporal da mobilização de leucócitos mediada pelo G-CSF em machos e fêmeas castrados e não castrados. A contagem basal de leucócitos não diferiu significativamente entre os grupos, porém em fêmeas não castradas a contagem foi menor. Após a castração dos animais houve uma redução do número de leucócitos após o tratamento com G-CSF em machos e em fêmeas, porém essa redução não foi significativa. Em machos tratados com G-CSF houve incremento de leucócitos em todos os períodos avaliados em relação à contagem basal (3, 6, 12 e 24h) ($p<0,05$). Em machos castrados tratados com G-CSF houve incremento de leucócitos apenas 6 e 12h após a droga. Em fêmeas tratadas com G-CSF houve incremento de leucócitos 6 e 12h após em relação a contagem basal ($p<0,05$), no entanto, em fêmeas castradas não houve incremento significativo. Em machos tratados com G-CSF a contagem leucocitária foi maior quando comparada a fêmeas (6, 12 e 24h) após, enquanto que em machos castrados essa diferença só foi observada com 12h ($p<0,05$). A tabela 5 mostra os valores da contagem diferencial de leucócitos entre machos e fêmeas castrados e não-castrados. Após dose única de G-CSF, a contagem de neutrófilos circulantes foi significativamente

maior em machos não castrados, porém, após a castração dos animais, o número de neutrófilos circulantes não diferiu entre machos e fêmeas.

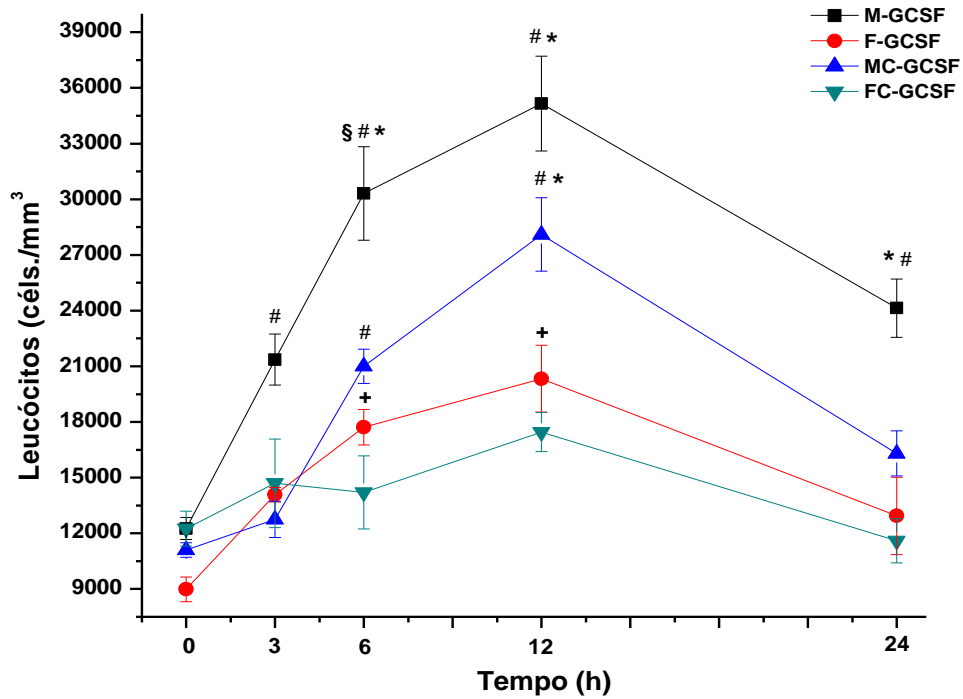


Figura 16. Leucócitos totais em machos e fêmeas castrados e não-castrados após G-CSF. [#] $p < 0,05$ vs. M-basal, ^{*} $p < 0,05$ vs. F-GCSF, [§] $p < 0,05$ vs. M-castrado, ⁺ $p < 0,05$ vs F-basal, (n=6 animais/grupo). Os valores estão apresentados como média \pm epm.

Tabela 5. Contagem diferencial de células sanguíneas periféricas de machos e fêmeas castrados e não-castrados, 12h após dose única de G-CSF

Parâmetros	F G-CSF	FC G-CSF	M G-CSF	MC G-CSF
Leucócitos	19375±3148	18200±914	27921±1270*	28100±1977*
Neutrófilos	11976±2105	11018±1047	20257±1017*	16127±834
% L. totais	62±5,1	61±7,3	72,6±1,7	58±6,89
Linfócitos	7112±1439	6730±1822	7174±495	11586±1498
% L. totais	36±4,9	36±8,2	25±1,36	41±2,9
Monócitos	286±55,1	253±32,4	576±148	386±127
% L. totais	1,5±0,2	1,1±0,48	4,25±2,2	1,3±0,3

Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs.fêmeas

FC: Fêmeas castradas, MC: Machos castrados

DISCUSSÃO

O G-CSF é uma citocina capaz de estimular a proliferação, diferenciação e a sobrevivência de células da linhagem granulocítica da medula óssea. Tem sido amplamente usado na clínica para o tratamento da mielosupressão após quimioterapia e neutropenias em geral.

Estudos mostram que as células tronco/progenitoras da medula óssea mobilizadas por G-CSF são capazes de migrar para tecidos não hematopoiéticos e provavelmente possam contribuir para regenerar tecidos que sofreram injúria através da sua plasticidade e possível transdiferenciação.

Orlic et al, (2001) mostraram que células tronco da medula óssea mobilizadas por citocinas têm a capacidade de migrar para o tecido cardíaco e se transdiferenciar em cardiomiócitos regenerando o tecido infartado. Entretanto, estudos mais recentes têm questionado a capacidade do G-CSF, mesmo associado a outras citocinas, a regenerar tecidos lesados por mecanismos de transdiferenciação.

Outros estudos ainda apontam que G-CSF não somente estimula a mobilização de células da medula óssea com capacidade regenerativa, mas também age nos tecidos através de outros mecanismos como a inibição de apoptose e estimulação da angiogênese (Ohtsuka et al, 2004).

Portanto, o uso do G-CSF vem sendo preconizado na terapia de várias doenças. Entretanto, os resultados são ainda bastante controversos. Os diferentes resultados obtidos por diferentes autores neste campo podem se dever, ainda que em parte, aos diferentes protocolos de tratamento (como dose e tempo de tratamento); ao uso de diferentes espécies (Suzuki et al, 2008) ou até mesmo a protocolos similares realizados em animais de diferentes sexos.

Recentemente Cheng et al, (2008) mostraram que o uso do G-CSF prejudicou o remodelamento e a função cardíaca de ratas fêmeas submetidas ao infarto do miocárdio. Outro estudo (Dias da Silva et al, 2005) mostrou que o tratamento de ratas geneticamente hipertensas (SHR) com células mononucleares da medula óssea ou com G-CSF era capaz de reduzir a pressão arterial, fato que não se repetiu em nosso laboratório quando o mesmo protocolo experimental foi realizado

em ratos SHR machos. Portanto, estes achados sugerem que diferenças sexuais podem interferir diretamente ou indiretamente nos efeitos desta citocina.

Sabendo que o principal efeito do G-CSF é estimular a mobilização de células da linhagem granulocítica da medula óssea para o sangue periférico, surgiu a idéia de comparar a mobilização de leucócitos para o sangue periférico em ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao mesmo protocolo de tratamento com G-CSF.

Estudos realizados em humanos e camundongos mostram que a administração de dose única de G-CSF induz uma neutropenia transiente seguida por um aumento de neutrófilos circulantes, em aproximadamente cinco vezes, que se inicia após 30 minutos e alcança o pico com 12 h pós injeção. Granulócitos maduros e imaturos (bastonetes e metamielócitos) são mobilizados dentro da circulação. Contudo, não foi observado aumento significativo de linfócitos, monócitos ou eosinófilos, demonstrando que a mobilização induzida por G-CSF é seletiva para neutrófilos (Link, 2005).

Em nosso estudo, fizemos inicialmente a escolha da dose ideal fazendo-se uma curva dose resposta com três diferentes (25, 50 e 100 μ g/kg) doses testadas em ratos machos e fêmeas. A hemocitometria foi realizada antes e 12h após dose única de G-CSF. Observamos que na contagem realizada antes (basal) da administração de G-CSF, o número de leucócitos foi maior em machos, embora essa diferença não tenha sido significativa. Após 12h o número de leucócitos totais aumentou significativamente nos animais tratados comparado aos animais controles, porém não houve diferença significativa entre as doses. Surpreendentemente, a contagem de leucócitos totais foi significativamente maior em machos tratados comparada a fêmeas.

Em seguida, um novo protocolo foi proposto no qual avaliamos o curso temporal de ação do G-CSF. Foi estipulada a dose de 50 μ g por induzir uma resposta biológica máxima. A contagem leucocitária foi realizada antes (basal) 3, 6, 12 e 24h após dose única de G-CSF em machos e fêmeas.

Ohdo et al, (1998) mostraram que a contagem basal de leucócitos variava de acordo com o ritmo circadiano, e que a resposta ao G-CSF também era dependente do ritmo circadiano. Os mecanismos envolvidos na influência do ritmo circadiano sobre a contagem basal de leucócitos podem estar associados com a ritmicidade da proliferação e diferenciação de células progenitoras da medula óssea, a mobilização de células maduras pré formadas da medula óssea e a destruição ou remoção

destas células. Neste estudo, a contagem basal de leucócitos realizada às 09:00h da manhã foi significativamente maior comparada a contagem realizada às 21:00h da noite. No mesmo estudo, a contagem de leucócitos realizada 24h após a injeção de G-CSF foi significativamente maior (50%) nos animais que receberam a droga às 07:00 h da manhã comparada aos animais que receberam às 19:00. Culturas de medula óssea obtidas nos dois períodos do dia resultaram em diferentes números de colônias mielóides mesmo quando tratadas dentro das mesmas concentrações de G-CSF *in vitro*. A atividade formadora de colônias do G-CSF foi significativamente mais potente às 07:00 do que às 19:00 horas, sugerindo que a sensibilidade das células da medula óssea ao G-CSF varia de acordo com o período do dia. As concentrações plasmáticas de G-CSF foram significativamente maiores em camundongos que receberam a droga às 07:00 do que às 19:00 horas. Tanto a sensibilidade das células da medula óssea ao G-CSF como a taxa de clearance renal da droga durante o período ativo dos animais, podem ter contribuído para estas variações. Portanto, em nosso estudo a dose foi administrada sempre no mesmo horário, para evitar possíveis flutuações decorrentes do ritmo circadiano.

Em nossos experimentos, a contagem basal de leucócitos sempre foi maior em machos, embora essa diferença não tenha sido significativa. Houve aumento da contagem de leucócitos 3h após a administração da droga em machos sugerindo um efeito mais precoce do G-CSF em machos do que em fêmeas. Com 6h houve aumento do número de leucócitos em ambos, machos e fêmeas, e a contagem leucocitária atingiu o pico com 12h tanto em machos quanto em fêmeas. Com 24h o número de leucócitos ainda estava alto em machos, porém em fêmeas já tinha retornado aos níveis basais. Portanto, estes dados sugerem uma diferença tanto no número de leucócitos totais como na cinética de ação da droga entre machos e fêmeas.

O G-CSF regula a proliferação e diferenciação de populações de células progenitoras da medula óssea e também estimula a mobilização de neutrófilos maduros pré-formados da medula óssea. A elevação da contagem de leucócitos no período inicial de ação da droga reflete a mobilização de neutrófilos maduros pré formados. No entanto, a elevação da contagem de leucócitos no período tardio reflete a proliferação e a diferenciação de células progenitoras da medula óssea.

Existem evidências de que o eixo CXCL12/CXCR4 pode ser interrompido durante a mobilização de neutrófilos por G-CSF. Estudos mostram que o tratamento

diário com G-CSF resulta na diminuição significativa da expressão de CXCL12 na medula óssea. Além disso, o G-CSF reduz a expressão de CXCR4 na superfície das células. Enquanto estes efeitos de G-CSF são considerados crônicos, estudos realizados em camundongos e humanos mostram que única injeção de G-CSF leva a um rápido aumento do número de neutrófilos circulantes. Esses resultados sugerem que G-CSF pode também inibir rapidamente a retenção do sinal liberado por CXCL12 agindo via CXCR4, enquanto estimula a mobilização aguda de neutrófilos da medula óssea. A administração diária de G-CSF, aumenta o número de neutrófilos na medula óssea e no sangue, sugerindo que G-CSF estimula tanto a produção quanto a liberação de neutrófilos (Furze & Rankin, 2008).

Para avaliação dos efeitos a longo prazo do G-CSF, os animais receberam o tratamento diário durante sete dias. Após sete dias, o número de leucócitos em machos aumentou significativamente comparado com a contagem realizada no primeiro dia, porém em fêmeas não houve aumento significativo, sugerindo uma distinta cinética de produção e liberação do *pool* de células da medula óssea estimulada por G-CSF em machos e fêmeas.

Para avaliar se as diferenças do G-CSF na mobilização de leucócitos em machos e fêmeas também ocorriam após injúria cardíaca, elaboramos o protocolo de infarto em ratos machos e fêmeas submetidos à ligadura coronariana para produção de infarto do miocárdio. Os animais receberam dose única de G-CSF trinta minutos após o procedimento cirúrgico, e após 12h, o sangue foi coletado através de punção cardíaca para a realização de hemograma com contagem automática de células. Doeing et al, (2003) mostraram que diferenças na contagem de leucócitos podem ser detectadas dependendo do tipo de técnica e da fonte sanguínea utilizada para a coleta. Neste estudo, a contagem basal de leucócitos do sangue coletado através da punção da veia safena ou da veia caudal de camundongos foi significativamente maior comparada com a contagem realizada no sangue coletado através da punção cardíaca, tanto em machos quanto em fêmeas. O estresse físico local aplicado durante a coleta do sangue através da veia safena pode causar a liberação de leucócitos dentro da circulação, alterando a concentração de leucócitos no sangue circulante. A resistência vascular e a estase sanguínea criada pela grande área de superfície no leito capilar podem ser responsáveis pela alta contagem de leucócitos no sangue coletado de locais periféricos. Diferentes tipos de anestésicos utilizados para a coleta de sangue através da punção cardíaca também

podem interferir na contagem de leucócitos (Diehl et al, 2001). Apesar disso, as diferentes fontes sanguíneas e técnicas utilizadas para a coleta neste estudo, não alteraram nossos resultados.

Surpreendentemente, o resultado obtido através do hemograma foi similar ao encontrado através da hemocitometria, apesar dos diferentes locais de coleta das amostras e técnicas utilizadas. A resposta ao G-CSF não foi alterada após o infarto do miocárdio e a contagem de leucócitos totais também foi maior em machos comparada a fêmeas. Nos animais submetidos ao infarto ou a cirurgia fictícia (controles), a contagem de leucócitos também foi maior em machos.

Sinha et al, (2006) mostraram que o estrogênio exerce um efeito antiinflamatório, limitando a infiltração de neutrófilos e macrófagos através da depressão (*downregulation*) da expressão de várias citocinas e quimocinas. O estrogênio também reduz a adesão de leucócitos (Santizo & Pelligrino, 1999).

Estudos realizados com machos e fêmeas submetidos ao infarto do miocárdio corroboram, pelo menos em parte, com nossos resultados, os quais mostraram que a infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco durante a fase aguda do infarto foi maior em machos comparada a fêmeas (Wuang et al, 2007). Recentemente, outro estudo confirmou o mesmo achado (Piro et al, 2010).

Um estudo feito com ratas submetidas ao infarto do miocárdio mostrou que G-CSF não exerceu nenhum efeito sobre a infiltração de células c-kit⁺ e leucócitos no miocárdio infartado (Cheng et al, 2008).

Para avaliarmos possíveis influências hormonais nos resultados iniciais obtidos em nosso estudo, animais pré-púberes (machos e fêmeas) foram castrados e após um mês de castração receberam dose única de G-CSF. A contagem leucocitária foi avaliada antes, 3, 6, 12 e 24h após a droga. Houve aumento maior do número de leucócitos mobilizados em machos castrados em comparação com as fêmeas castradas 12h após o tratamento. Esses dados sugerem que a castração não interferiu na diferença de mobilização entre os sexos. No entanto, após a castração, o número de leucócitos diminuiu em ambos os sexos quando comparado ao grupo não castrado; embora esta diminuição não tenha sido significativa. No grupo não-castrado, o número de neutrófilos circulantes também foi maior em machos, porém após a castração, não houve diferença significativa entre machos e fêmeas. Este achado sugere uma possível influência hormonal nos níveis basais de leucócitos e mesmo na mobilização induzida pelo G-CSF.

Doeing et al, (2003) mostraram que a contagem basal de leucócitos no sangue periférico foi similar em camundongos machos e fêmeas, porém na contagem diferencial, o número de neutrófilos em fêmeas foi significativamente menor comparado a machos. Estes dados sugerem que hormônios sexuais exercem um efeito na regulação de leucócitos circulantes.

Estudos mostram que hormônios esteróides femininos, 17β -estradiol e progesterona, podem modular a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos sanguíneos periféricos humanos, enquanto afetam sua circulação e ativação (Chernyshov et al, 2002). Camundongos tratados com estradiol apresentam diminuição do número de neutrófilos que pode estar relacionado com a infiltração de neutrófilos dentro do útero (England & Bain, 1976). Outros estudos têm indicado a influência do estado reprodutivo (ciclo estral) nas concentrações e funções dos neutrófilos (Subandrio et al, 2000).

Shevde & Pike, (1996) mostraram que a perda da função ovariana em ratas ovariectomizadas causou aumento do número de CFU-GM (unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos) e células tronco/progenitoras mais primitivas, e que a administração de 17β -estradiol em ratas ovariectomizadas bloqueou o aumento tanto de CFU-GM quanto de progenitores mielóides primitivos.

A consequência da ação do estrogênio nas células tronco hematopoiéticas primitivas pode se estender além da osteoclastogênese. O efeito supressor do estrogênio nas células tronco mielóides multipotentes sugere a probabilidade de que várias linhagens hematopoiéticas podem ser afetadas, incluindo as que produzem eritrócitos, plaquetas, monócitos e neutrófilos. Existem evidências de que o estrogênio representa um amplo papel na hematopoiese, e que o papel desse hormônio não é restrito exclusivamente a ontogênese dos osteoclastos. Estudos mostram que o tratamento com estrogênio induziu anemia, neutropenia e trombocitopenia em cães e aumentou a eritropoiese e megacariocitopoiese em camundongos.

Perry et al, (2000) mostraram que a administração de alta dose de estrogênio causou um rápido declínio do número de leucócitos dentro da medula óssea de camundongos. Outro estudo relatou que a administração de doses fisiológicas de estrogênio inibiu várias linhagens hematopoiéticas em ratas ovariectomizadas (Erben et al, 1998). Outro estudo mostrou que a administração de alta dose de

estrogênio reduziu o número de células linfóides e granulocíticas duas semanas após o tratamento (Gaunt & Pierce, 1985).

Rosenblun et al, (1974) mostraram que diferenças sexuais podem afetar a formação de colônias mielocíticas *in vivo* e *in vitro*, sugerindo uma influência inibitória de estrógenos e um efeito estimulatório de andrógenos. O tratamento com estradiol em camundongos irradiados reduziu o número de colônias mielocíticas no baço, e o tratamento com estradiol de doadores de medula óssea reduziu a sua capacidade de formar colônias mielocíticas após o transplante.

Hormônios sexuais, incluindo andrógenos e estrógenos, têm sido implicados diretamente na regulação funcional da célula hematopoiética (Notta et al, 2010).

Ray et al, (2008) mostraram a influência de diferenças sexuais sobre as concentrações de células progenitoras hematopoiéticas em amostras de sangue coletadas no cordão umbilical. Em meninos as concentrações de células CD34+ foram significativamente maiores do que em meninas. Essa diferença também foi observada em humanos adultos. Homens têm maior número de células formadoras de colônias, colônias eritroblásticas e macrófago-granulocíticas no sangue periférico comparado a mulheres.

Esses estudos mostram claramente a influência de hormônios sexuais sobre a hematopoiese, em diferentes espécies, modulando a expressão de moléculas de adesão, citocinas e quimocinas. Contudo, o papel dos hormônios sexuais sobre a linhagem granulocítica e a sua relação com outros fatores estimulantes de colônias, especificamente o G-CSF, não são claros. Em nosso estudo, não foi estabelecida nenhuma correlação entre hormônios sexuais endógenos e as diferenças encontradas após a administração de G-CSF, visto que a castração dos animais não modificou os resultados obtidos, embora tenha reduzido o número de neutrófilos circulantes. Futuros estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais G-CSF age sobre o número de células da linhagem granulocítica em machos e fêmeas, e se realmente existe alguma influência hormonal ou se a diferença encontrada reflete apenas um efeito constitutivo.

6. CONCLUSÃO

De acordo com as informações obtidas em nosso estudo, podemos concluir que o tratamento com G-CSF:

- Induziu maior mobilização de leucócitos periféricos em ratos machos comparada a fêmeas, tanto após dose única quanto após doses sucessivas;
- Induziu maior mobilização de leucócitos em machos após o infarto do miocárdio;
- Estimulou maior número de neutrófilos circulantes em machos;
- A castração não aboliu a diferença entre machos e fêmeas, visto que a mobilização de leucócitos após a castração também foi maior em machos, confirmando um dimorfismo sexual em resposta ao G-CSF.

7. REFERÊNCIAS

Abdalla FK. Single dose filgrastim in cytotoxic-induced neutropaenia in children. *East Afr Med J* 2008; 85: 30-35.

Anderlini P, Champlin RE. Biologic effects of granulocyte colony- stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood* 2008; 111: 1767-1772.

Avalos BR, Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor *Blood* 1996; 88: 761-777.

Barreda DR, Haningtona PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 509-554.

Blank U, Karisson G, Karisson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 2008; 111: 492-503.

Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin in Hematol* 2008; 15: 49–58.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells: The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell. *Am J Pathol* 2006; 169: 338-346.

Chae HD, Lee KE, Williams DA, Gu Y. Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2008; 111: 2597-2605.

Cheng Z, Ou L, Liu X, Li F, Steinhoff G. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates cardiac fibrosis after myocardial infarction in a rat cardiac fibrosis after

myocardial infarction in a rat model of permanent occlusion. *Cardiovasc Res* 2008; 80: 425-434.

Chernyshov VP, Vodianykh MO, Hrekova SP. Effect of female steroid hormones on expression of adhesion molecules by peripheral blood leukocytes. *Fiziol Zh* 2002; 48: 46-53.

Christopher MJ, Link DC: Regulation of neutrophil homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 3-8.

Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 2009; 114: 1331-1339.

Dar A, Kollet O, Lapidot T. Hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 2006; 34: 967-975.

Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791-2808.

Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1-47.

Dias da Silva VJ, Machado MPR, Rocha AM, Franchini KG, Voltarelli JC. Bone marrow stem/progenitor cells reduce arterial blood pressure and ameliorate endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *FASEB J* 2005; 19: 7439-7439.

Doering DC, Borowicz, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail foot, and saphenous vein puncture. *BMC Clin Pathol* 2003; 3:3

Dong F, Larner C. Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the janus kinases. *Blood* 2000; 95: 1656-1662.

Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil from the bone marrow under basal and granulopoiesis conditions. *Blood* 2009; 113: 4711-4719.

England JM, Baim BJ. Total and differential leukocyte count. *Br J Haematol* 1976; 33: 1-7.

Erben RG, Raith S, Erbele J. Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation the monocytemacrophage precursors in rat bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 274: 476-483.

Fischer JC, Frick M, Wassmuth R, Platz A, Punzel M, Wernet P. Superior mobilization of haematopoietic progenitor cells with glycosylated G-CSF in male but not female unrelated stem cell donors. *Br J Haematol* 2005; 130: 740-746.

Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 2008; 125: 281-288.

Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 2008; 22: 3111-3119.

Gaunt SD, Pierce KR. Myelopoiesis and marrow adherent cells in estradiol-treated mice. *Vet Pathol* 1985; 22: 403-408.

Gordon MY, Bachellier P, Welsh JP, Marley SP, Lechler R. Characterization and clinical application of human CD34 stem/progenitor cell populations mobilized in to the blood by granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24: 1822-1830.

Gupta V, Singh SM. Gender dimorphism in myeloid differentiation of bone marrow precursor cells in a murine host bearing a T cell lymphoma. *Am J Reprod Immunol* 2007; 74: 90-102.

Gupta V, Singh SM. Gender dimorphism of macrophage response to GM-CSF AND IL-4 for differentiation into dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 43-54.

Jin F, Zhai Q, Qiu L, Meng H, Zou D, Li Q, Zhou B. Degradation of BM SDF-1 por MMP-9: the role in G-CSF- induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone marrow Transplant* 2008; 42: 581-588.

Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Takashi H, Kakumitsu H, Yoshie M, Yanamoto M, Takeda K, Matsuda T, Akira S, Ogawa K, Harada M. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 2005; 23: 252–263.

Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Niche-to- niche migration of bone marrow-derived cells. *Trends mol med* 2007; 13: 72-81.

Kim KH, Sierra M, Williams KC, Gulino VA, Tosato G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 2006; 108: 812-820.

Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253-262.

Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 360-376.

Koning JP, Soed-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, Leeuwen DV, Touw IV. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Oncogene* 2000; 19: 3290-3298.

Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 973-81.

Levesque JP, Winkler IG, Larsen SR, Rasko JE. Mobilization of bone marrow-derived progenitors. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 180: 33-36.

Link DC. Neutrophil homeostasis. *Immunol Res* 2005; 32: 169-178.

Maianski NA, Kuijpers TW. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 2002; 99: 672-679.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62: 609-614.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989; 339: 27-30.

Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: Molecular, cellular and clinical aspects. *Science* 1991; 254: 529-533

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008; 111: 485-491.

Micallef IN, Apostolidis J, Rohatiner AZ, Wiggins C, Crawley CR, Foram JM, Leonhardt M. Factors which predict unsuccessful mobilization of peripheral blood

progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol J* 2000; 1: 367-373.

Molineux G, Migdalska A, Szmitowski M, Zsebo K, Dexter TM. The effects on hematopoiesis of recombinant stem cell factor (ligand for c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 78: 961-966.

Moog R. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1: 189-201.

Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Ono M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; 319: 415-418.

Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *J Cell Biochem* 2006; 99: 690–705.

Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258: 9017-9023.

Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Harada M. Signal Transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/Enhancer-binding protein α in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *J Biol Chem* 2005; 280: 12621-12629.

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844-2853.

Ohdo S, Arata N, Furukubo T, Yukawa E, Ogawa N. Chronopharmacology of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 242-246.

Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, Nakaya H, Komuro I. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 2004; 18: 851-853.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells repair the infarcted heart improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349.

Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and emergency hematopoiesis. *Cytokine* 2008; 48: 277-288.

Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004; 103: 1580-1585.

Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and Stem cells in motion. *Blood* 2008; 111: 3923-3930.

Perry MJ, Bird D, Tobias JH. Effects of high-dose of estrogen on murine hematopoietic bone marrow precede those on osteogenesis. *Am J Physiol endocrinol Metab* 2000; 279: 1159-1165.

Petit I, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 787: 687-694.

Petty JM, Lenox CC, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *J Immunol* 2009; 182: 604-612.

Piro M, Della Bona R, Crea F. Sex- Related Differences in Myocardial Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1057-65.

Pitchford SC, Furze CR, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential Mobilization of Subsets of Progenitor Cells from the Bone Marrow . *Cell Stem Cell* 2009; 4: 62–72.

Raam BJV, Drewniak A, Kuijpers TW. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3. *Blood* 2008; 112: 2046-2054.

Rane SG, Reddy EP. Jaks, Stats and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 2002; 21: 3334-3358.

Rosenblum AL, Bull JM, Carbone PP. Parameters of marrow proliferative capacity in vitro: detection of a sex difference in normal human granulopoiesis. *Blood* 1974; 43: 841-846.

Santizo R, Pelligrino DA. Estrogen reduces leukocyte adhesion in the cerebral circulation of female rats. *J cereb Blood Flow Metabol* 1999; 19:1061-1065.

Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* 2002; 17: 413–423.

Shevd NK, Pike JW. Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. *Blood* 1996; 87: 2683-2692.

Sinha I, James C, Henke PK. Female Gender attenuates cytokine and chemokine Expression and leukocyte recruitment in experimental rodent abdominal aortic aneurysms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1085: 367-379.

Smart N, Riley PR. The Stem Cell Movement. *Circ Res* 2008; 102: 1155-1168.

Subandrio AL, Sheldon IM and Noakes DE. Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. *Theriogenology* 2000; 53: 1591-608.

Suratt BT, Petty MJ, Young SK, Malcolm KC. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 2004; 104: 565-571.

Suzuki M, Fujii E, Kato C, Yamazaki M. Differences in bone responses to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor between mice and rats. *J. Toxicol. Sci* 2008; 33: 245-249.

Tanaka H, Kaneko T. Sex differences in the pharmacokinetics of recombinant human Granulocyte colony-stimulating factor in the rat. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 1034-1039.

Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 183-189.

Vasu S, Leitman SF, Tisdale JF, Hsieh MM, Childs RW, John Barret A, Fowler DH. Donor demographic and laboratory predictors of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in an ethnically diverse population. *Blood* 2008; 112: 2092-2100.

Vietinghoff SV, Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 2008; 181: 5183-5188.

Wang F, Keimig T, Ding J. Augmented healing process in female mice with Acute myocardial infarction. *Gen Med* 2007; 4: 230-247.

Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 2008; 111: 42-49.

Zhang Y, Cheng G, Yang K, Fan R, Zhuwei X, Chen L, Liu O, Yang A, Jin B. A novel function of granulocyte colony stimulating factor in mobilization of human hematopoietic progenitor cells. *Immunol Cell Biol* 2009; 87: 428-432.