

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ARIANY OLIVEIRA SANTOS

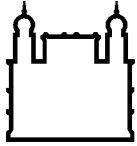
**PAPEL DA LAMININA NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T
EM MODELO MURINO DE
TRANSPLANTE CARDÍACO ALOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ingo Riederer

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ARIANY OLIVEIRA SANTOS

**PAPEL DA LAMININA NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T
EM MODELO MURINO DE
TRANSPLANTE CARDÍACO ALOGÊNICO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ingo Riederer

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Andrea Henriques Pons - Presidente

Prof. Dra. Luciana Garzoni

Prof. Dra. Fernanda Pinto Mariz

Prof. Dra. Mariana Waghabi

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida

Rio de Janeiro, 30 de Janeiro de 2014.

Dedico este trabalho à minha família, que sempre esteve ao meu lado em todas as minhas conquistas.

Agradecimentos

A Deus, ser supremo e criador, pela proteção e bênçãos recebidas.

Aos meus pais, pelo apoio, exemplo e compreensão que foram fundamentais ao longo desta caminhada.

Aos meus familiares, em especial, meu padrinho João, Vovó Zica e Vovô Zico, pelos conselhos, estímulos e toda ajuda e carinho que sempre me proporcionaram.

Ao meu namorado, Raphael, pelo apoio nos momentos de estresse e por ter escutado minhas reclamações e angústias nos momentos mais difíceis desses dois anos.

Aos meus primos, Felipe, Denis, Lucas, Flávio e Gustavo, que são como irmãos para mim, e que sempre estão ao meu lado, dando forças, incentivo e vibrando a cada vitória conquistada.

Às minhas amigas, Ju, Julia e Day, pelos momentos de diversão, descontração e confidências, que sempre foram fundamentais para me manter firme nessa trajetória.

Ao meu orientador, Ingo Riederer, por todo conhecimento e experiências proporcionadas.

Ao ex-chefe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Dr. Wilson Savino, pela oportunidade e confiança.

Ao atual chefe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo e revisor deste trabalho, Dr. Vinicius Cotta de Almeida, pelas sugestões e críticas construtivas.

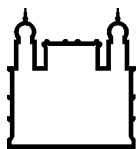
Aos membros da banca, Dra. Andrea Henriques Pons, Dra. Luciana Garzoni, Dra. Fernanda Pinto Mariz, Dra. Mariana Waghabi, por terem aceitado o convite e pelas críticas e sugestões que serão certamente muito importantes para o enriquecimento desse trabalho e para minha formação científica.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Dra. Eliane Van Vliet, Marina Trajano, Luiz Ricardo Berbert e Camila Sanches, pela grande ajuda na execução dos experimentos e pelo companheirismo.

Aos demais amigos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Arnon, Ailin, Bruno, Carol, Daiane, Daninha, Danielma, Elaine, Jairo, Julia, Juliana, Larissa, Luciana, Marcia, Rodrigo, Thiago, Pedro, pelo companheirismo, ajuda, conselhos e momentos de descontração.

Às agências financiadoras, Fiocruz e CNPq.

"No esforço para compreender a realidade somos como um homem tentando entender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros, ouve o seu tique-taque, mas não tem meios para abrir a caixa. Se esse homem for habilidoso, poderá imaginar um mecanismo responsável pelos fatos que observa, mas nunca poderá ficar completamente seguro de que sua hipótese seja a única possível." Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

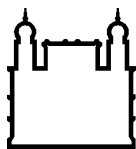
PAPEL DA LAMININA NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM MODELO MURINO DE TRANSPLANTE CARDÍACO ALOGÊNICO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ARIANY OLIVEIRA SANTOS

Durante o processo de rejeição, linfócitos T do receptor são ativados e migram para o enxerto. A glicoproteína laminina (LM) é importante na migração e posicionamento de linfócitos durante a rejeição, porém dados sobre o papel das diferentes isoformas neste processo são escassos. Usando um modelo de transplante cardíaco alogênico, nosso grupo verificou que o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-LM diminuiu o infiltrado inflamatório e a deposição de LM nos enxertos cardíacos. No presente trabalho, caracterizamos os linfócitos T presentes nos linfonodos de drenagem e aloenxertos, a expressão das isoformas de LM nos aloenxertos e seu papel na migração dos linfócitos T. Nos aloenxertos, observamos um aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e um maior enriquecimento de linfócitos CD8⁺ ativados, quando comparado aos enxertos isogênicos. Por qPCR, verificamos que somente a cadeia LAMB3, constituinte da LM332, teve sua expressão aumentada nos aloenxertos. Por imunofluorescência, verificamos uma maior deposição de LM332 e da cadeia LAMB3 nos aloenxertos. Para verificar o papel da LM332 na migração dos linfócitos T, realizamos ensaios de migração e observamos uma migração reduzida dos linfócitos T frente a LM332, quando comparado aos grupos controle. Esse resultado sugere que a LM332 pode promover uma forte adesão, influenciando a migração dos linfócitos T alorreativos. A análise das isoformas de LM durante a rejeição será importante para o entendimento da migração das células efetoras durante esse processo e poderá ajudar a definir estratégias terapêuticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**PAPEL DA LAMININA NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM
MODELO MURINO DE TRANSPLANTE CARDÍACO ALOGÊNICO**

ABSTRACT

MASTER THESIS

ARIANY OLIVEIRA SANTOS

During rejection process, recipient T cells are activated in lymph nodes and migrate to the graft. The glycoprotein laminina (LM) is important in lymphocyte positioning and effector function during alloreactive responses. Using a model of allogeneic heart transplantation, where hearts from neonatal C57BL/6 mice were transplanted in the ear of adult BALB/c recipients, treatment with anti-LM mAb decreased the cellular infiltrate and LM deposition within the grafts. In this work, we characterized T cells in allografts, evaluate LM isoform expression and their role on T lymphocyte migration in the model described above. In allografts, we observed an increase of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, and an enrichment of activated CD8⁺ T cells, when compared to the isografts. By qPCR, only LAMB3 chain, component of the LM332 isoform, was increased in allografts. Additionally, we observed higher deposition of LM332 in allografts by immunofluorescence. To check the role of LM332 on T cell migration, we performed *ex vivo* experiments and observed a reduced LM332-driven migratory response of lymphocytes from lymph nodes. Our data suggest that the predominance of T cells in allografts can be related to an enhanced contact of T cells with LM332, as no haptotactic effect of the intact LM332 was observed. Analysis of the role of LM isoforms during the rejection process will be important to understand the trafficking process of effector cells during graft rejection and might help to define new therapeutical strategies.

Sumário

1- Introdução.....	11
1.1- Rejeição de transplantes.....	11
1.2- Ativação dos linfócitos T na rejeição de transplantes.....	12
1.3- Órgãos linfoides secundários.....	14
1.4-Migração celular linfocitária.....	16
1.5-Matriz extracelular (ECM).....	17
1.6- Laminina.....	18
2- Justificativa e objetivos.....	22
2.1- Objetivo Geral.....	23
2.1.1- Objetivos específicos.....	23
3- Metodologia.....	24
3.1- Animais.....	24
3.2- Técnica do transplante cardíaco.....	24
3.3- Fenotipagem dos linfócitos T.....	25
3.4- Análise da expressão das cadeias de LM por PCR em tempo real.....	26
3.5- Análise da deposição de LM111, LM332, LAMA1 e LAMB3.....	29
3.6- Ensaio de quimiotaxia.....	29
3.7- Análises estatísticas.....	29
4- Resultados.....	29
4.1- Análise dos linfonodos de drenagem.....	31
4.1.1- Tamanho e celularidade dos linfonodos de drenagem.....	31
4.1.2- Caracterização das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ presentes nos linfonodos de drenagem.....	32
4.1.3- Análise do perfil de ativação das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ nos linfonodos de drenagem.....	33
4.1.4- Análise da deposição de LM111 nos linfonodos de drenagem.....	34
4.2- Análise dos enxertos cardíacos.....	36
4.2.1- Aspecto macroscópico e número de linfócitos do infiltrado Inflamatório presente nos enxertos cardíacos.....	36
4.2.2- Caracterização das populações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ presentes no infiltrado inflamatório.....	37

4.2.3- Perfil de ativação dos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ presentes no infiltrado inflamatório dos enxertos cardíacos.....	38
4.2.4- Expressão das cadeias de laminina nos enxertos cardíacos.....	39
4.2.5- Deposição da isoforma LM111 e da cadeia LAMA1 nos enxertos cardíacos.....	41
4.2.6- Deposição da isoforma LM332 e da cadeia LAMB3 e nos enxertos cardíacos.....	43
4.2.7- Proximidade entre linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ com células positivas para LM332.....	45
4.3- Capacidade migratória dos linfócitos T frente a LM332.....	46
5- Discussão e Perspectivas.....	48
6- Referências bibliográficas.....	57

1- Introdução

1.1- Rejeição de transplantes

O processo de rejeição a um determinado enxerto começou a ser caracterizado como uma resposta do sistema imune na década de 50, com os experimentos clássicos de Billingham e colaboradores (1). Nestes experimentos, foi demonstrado que enxertos de pele transplantados de um animal A para um animal B, eram rejeitados em cerca de 10 dias, fenômeno conhecido como “resposta primária da rejeição” ou rejeição aguda. Um transplante subsequente do mesmo doador para um receptor já transplantado levava a uma rejeição em menos de seis dias; resposta acelerada conhecida como “resposta secundária da rejeição”, e que demonstra a indução de uma memória imunológica. Entretanto, se o segundo enxerto fosse proveniente de um doador não relacionado com o doador do primeiro enxerto, não ocorria a “resposta secundária da rejeição”, demonstrando a especificidade antigênica deste fenômeno. Por outro lado, a implantação intraperitoneal de fragmentos de linfonodos de um animal A previamente enxertado, levava a uma “resposta secundária da rejeição” em um animal B que não tinha sido previamente transplantado, caracterizando assim, a rejeição como uma resposta do sistema imune adaptativo (1).

A rejeição é um fenômeno imunológico que ocorre em resposta a um transplante alogênico (o doador e o receptor são indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes), e é causada pelas diferenças genéticas entre o doador e o receptor, diferença principalmente encontrada nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O mesmo não ocorre em transplantes isogênicos, pois o doador e o receptor do tecido ou órgão transplantado são indivíduos geneticamente idênticos, sendo assim não há rejeição (2, 3).

A resposta imune é a principal barreira para a sobrevivência de um tecido alotransplantado. Embora a resposta humoral possa também contribuir para a destruição do tecido transplantado, linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ são as células principais no processo de rejeição (3-5). O papel crítico de células T na rejeição de um aloenxerto foi primeiramente estabelecido em experimentos com camundongos neonatos timectomizados e camundongos atímicos (“*nudes*”), que falharam em

efetuar a rejeição (6). Além disso, experimentos de reconstituição celular mostraram que linfócitos T recirculantes, transferidos para hospedeiros letalmente irradiados, foram suficientes para restaurar a rejeição alogênica de pele e coração, independentemente de produção de aloanticorpos (7).

Apesar da presença marcante de células T citotóxicas em aloenxertos (8-10), células T CD4⁺ são centrais em iniciar e orquestrar a resposta imune neste processo (11-13), por meio da secreção de citocinas e suporte na ativação de outras células efetoras, incluindo além de linfócitos T CD8⁺, macrófagos e monócitos (14, 15). De fato, células T CD4 são capazes de promover a rejeição de enxertos cardíacos na ausência de linfócitos B e células T CD8 (16).

1.2- Ativação dos linfócitos T na rejeição de transplante

O reconhecimento do órgão transplantado como não próprio ocorre pelas diferenças genéticas entre o doador e o receptor. Essas diferenças são essencialmente encontradas nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC); devido ao fato destas moléculas serem altamente polimórficas, havendo múltiplas variantes de cada gene dentro da população como um todo (3).

As moléculas de MHC presentes na superfície das células do órgão transplantado são reconhecidas pelos linfócitos T do receptor, mediadores predominantes na rejeição (2, 17). Nesta forma de rejeição dependente de linfócitos T, há evidências da ocorrência de três vias de apresentação do aloantígeno: a via de apresentação direta, em que os linfócitos T do receptor reconhecem as moléculas de MHC intactas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) do doador; a via indireta, onde as APCs do receptor reconhecem, fagocitam e apresentam o MHC do doador aos linfócitos T do receptor; e a via semidireta, em que as APCs do receptor adquirem as moléculas de MHC através do contato direto célula-célula com a APC do doador e/ou pela fusão com exossomos liberados por estas APCs do doador (fig.1.2) (18).

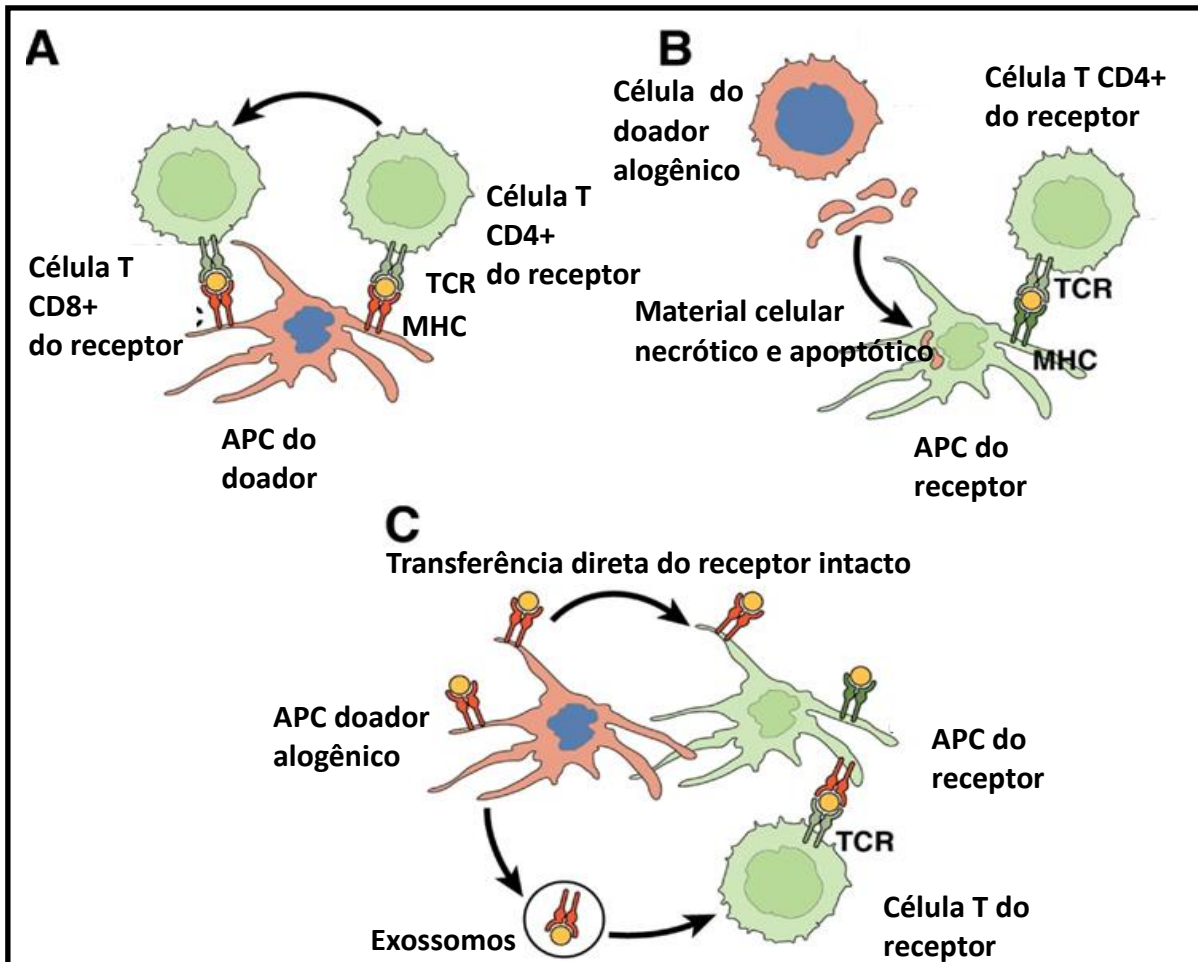


Figura 1.2 – Vias de apresentação de aloantígenos. A) Via de reconhecimento direto. B) Via de reconhecimento indireto. C) Via de reconhecimento semidireto. (Sanchez-Fueyo, A., 2011).

As APCs, após captarem os antígenos, migram em direção aos linfonodos de drenagem, onde acontecem os eventos principais de apresentação de antígeno. Nos linfonodos de drenagem os linfócitos T virgens (linfócitos T não ativados) recirculantes, específicos para o antígeno que está sendo apresentado, reconhecerão este peptídeo e serão ativados (3).

Para uma ativação efetiva dos linfócitos T, são necessários dois sinais. O principal deles é mediado pela ligação do complexo receptor clonal de células T (TCR) /CD3 com o complexo MHC-peptídeo antigênico presente na superfície das APCs, e as moléculas CD4 ou CD8 que se ligam na região monomórfica da molécula de MHC II e I, respectivamente (19). O segundo sinal é mediado por várias

interações coestimulatórias entre o linfócito T e a APC, uma destas interações é a ligação da molécula CD28 (nos linfócitos) com seus dois ligantes CD80 ou CD86 (nas APCs), que contribui para a produção de IL-2. Esta citocina, ao se ligar ao seu receptor presente nos linfócitos, estimula a proliferação, e age como fator de sobrevivência para estes linfócitos (3).

Moléculas de adesão presentes nos linfócitos, como LFA-1, CD2, CD44, e uma série de receptores de matriz extracelular (ECM) como, por exemplo, as integrinas beta1, ao serem estimuladas por seus ligantes induzem proliferação e produção de IL-2 pelos linfócitos T, contribuindo para uma ativação efetiva destas células (20-22). Uma vez ativadas, essas células estão prontas para realizar sua função efetora (3). Além do processo descrito acima, linfócitos T de memória (específicos para antígenos diversos) presentes no receptor podem, por reação cruzada, serem diretamente ativadas no sítio de rejeição pelas APCs do doador. Sendo estas células previamente ativadas, o processo de ativação/proliferação seria mais rápido e potente, amplificando ainda mais a resposta contra o órgão transplantado (23, 24).

1.3- Órgãos linfoides secundários

Os linfócitos são encontrados em grande número nos órgãos linfoides, onde se encontram agregados a uma rede de proteínas da matriz extracelular e células não linfoides. Os órgãos linfoides podem ser divididos em órgãos linfoides primários (como o Timo e a Medula Óssea), tecido onde os linfócitos são gerados, e órgãos linfoides secundários, onde os linfócitos virgens são ativados, iniciando assim a resposta imune adaptativa (3). Os órgãos linfoides secundários compreendem os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides de mucosa. Estes órgãos são compostos por macrófagos residentes, células dendríticas e linfócitos agregados em uma rede de células estromais e moléculas da ECM, que promovem a organização estrutural do tecido e fornecem sinais de sobrevivência para os linfócitos. Estes órgãos linfoides são especializados em reter células dendríticas que carregam antígenos, facilitando assim o encontro destas com os linfócitos virgens, levando a ativação destes (3).

Apesar da demonstração de que células de memória podem ser diretamente ativadas no sítio de rejeição, os tecidos linfoides secundários parecem possuir papel

fundamental durante a montagem de uma resposta imunológica. Em 1968, Barker e Billingham demonstraram que a “eliminação” da drenagem linfática preveniu a destruição de enxertos de pele (23).

Atualmente é aceito que enxertos não vascularizados necessitam dos órgãos linfoides secundários para que ocorra o início da resposta aloespecífica (25), enquanto que transplantes vascularizados podem ser rejeitados independentemente da presença de órgãos linfoides secundários (26). Porém, dados da literatura são controversos em relação a esse fenômeno (27, 28). Nesse sentido, foi demonstrado em modelo de transplante traqueal intrapulmonar em camundongos deficientes em órgãos linfoides secundários, que após a neogênese linfoide, os aloenxertos foram rejeitados, reforçando o papel dessas estruturas durante a resposta imunológica (29).

No início do processo de rejeição, antígenos livres e células dendríticas que estão ligadas ao peptídeo antigênico migram do sítio de inflamação, através dos vasos linfáticos aferentes, para os linfonodos de drenagem, órgão linfoide secundário onde ocorre a ativação dos linfócitos. A entrada dos linfócitos nos linfonodos se dá através de vasos sanguíneos especializados, denominados vênulas do endotélio alto (HEV; do inglês, “high endothelial venules”). Uma das principais moléculas responsáveis por esse processo é a molécula de adesão celular da família das selectinas, denominada L-selectina ou CD62L, presente nos linfócitos T virgens, que se liga a CD34 e GlyCAM1, carboidratos sulfatados presentes nas HEVs (3, 30).

Após entrarem nos linfonodos, os linfócitos são ativados e passam por um processo de proliferação e diferenciação, perdem a expressão do CD62L e passam a expressar ou aumentam a expressão de outros marcadores que serão fundamentais no direcionamento específico destas células para o sítio da resposta efetora (fenômeno conhecido como “homing”). Por exemplo, linfócitos ativados aumentam a expressão da glicoproteína CD44. Este ligante de ácido hialurônico é utilizado como um marcador para detectar linfócitos T ativados. Além do aumento da expressão de diversas moléculas coestimulatórias, descritas anteriormente, há o aumento da expressão de receptores da família das integrinas, que são proteínas da superfície celular, que se ligam a moléculas presentes no endotélio e também às proteínas da ECM. Após esses processos, os linfócitos ativados saem dos linfonodos via vaso linfático eferente e vasos sanguíneos, podendo assim chegar ao sítio de resposta efetora (3).

1.4- Migração celular linfocitária

Além das diferenças genéticas entre o doador e o receptor, que leva à ativação linfocitária do hospedeiro, o procedimento cirúrgico decorrente do transplante causa uma inflamação local e, dessa forma, fatores solúveis como citocinas e quimiocinas vão agir sobre o endotélio, o tecido enxertado e conseqüentemente sobre as células inflamatórias (31-33).

No sítio do transplante, os vasos sanguíneos passam a expressar moléculas que vão primeiramente se ligar aos linfócitos que estão circulando na corrente sanguínea. Essa fraca adesão inicial mediada pela ligação das selectinas, presentes nos linfócitos, com carboidratos sulfatados, presentes no endotélio, se torna mais forte após a sinalização produzida pelas quimiocinas presentes no endotélio vascular do sítio inflamatório, que induz a ativação de moléculas de adesão, como as integrinas. Então, uma firme adesão é estabelecida entre o linfócito e o endotélio e, em seguida, o linfócito é capaz de atravessar a barreira endotelial e, posteriormente, chegar à região inflamatória, como por exemplo, a região do transplante (Fig.1.4). (3, 31, 33-35).

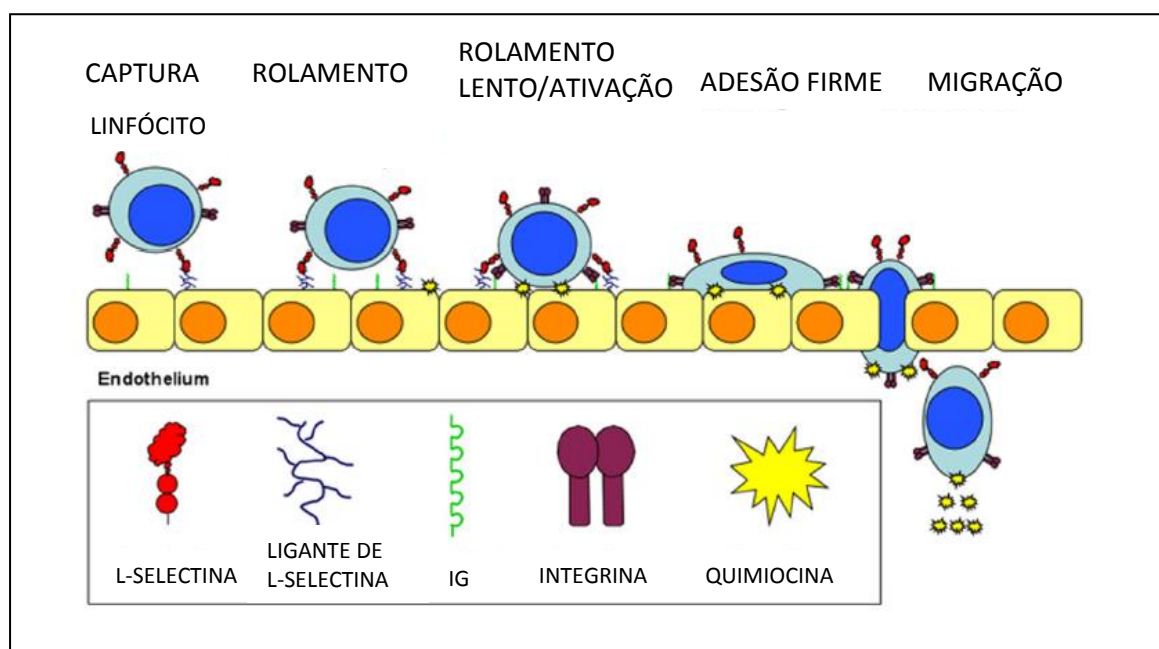


Figura 1.4. – Transmigração de linfócito pelo endotélio vascular (modificado de Grailer, J.J., 2009). Inicialmente, os linfócitos aderem fracamente ao endotélio,

fazem o rolamento e somente após uma adesão forte é que essas células vão migrar por esse endotélio (transmigração).

1.5- Matriz extracelular (ECM)

Proteínas da ECM são de extrema importância para dar suporte nos processos de entrada e saída dos linfócitos, bem como a migração destas células dentro do linfonodo (36), e fornecer sinais de sobrevivência, proliferação e ativação para os linfócitos (37-39). Essas moléculas estão presentes tanto nas membranas basais que envolvem os vasos quanto no interstício de diversos órgãos. Nesse contexto, as células necessitam atravessar a membrana basal, no processo de transmigração, e uma vez no tecido, estarão em contato direto com essa rede (40-43).

A ECM é, nos organismos multicelulares, uma complexa rede de macromoléculas que forma o tecido conjuntivo adjacente às células epiteliais, as membranas basais e o espaço extracelular nos diversos tecidos, além de formar estruturas como cartilagens, tendões, ossos e dentes. Ela é constituída por diferentes proteínas como os colágenos, elastina, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, como a laminina e a fibronectina, que desempenham suas funções de maneira interativa (Fig. 1.5) (44-46).

As glicoproteínas e carboidratos da ECM, não apenas servem como suporte mecânico formando uma rede estabilizadora das estruturas teciduais, mas, possuem papel ativo em contato com as células, modulando funções dependentes do citoesqueleto, como motilidade e fagocitose (47, 48). Particularmente no sistema imune, elementos de ECM estão envolvidos em processos de diferenciação, migração e ativação de linfócitos (39, 49-51).

A análise de tais componentes é importante porque não somente servem como suporte estrutural para a adesão e manutenção da integridade tissular, mas também são utilizados como reservatórios para vários tipos de mediadores biológicos, incluindo enzimas de degradação, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e de diferenciação celular, como citocinas e quimiocinas. Experimentos têm sugerido que determinados fatores de crescimento, no momento de sua associação à ECM, podem agir como indutores da migração celular, enquanto outros agem como sinal de parada de migração (52).

No processo de rejeição de transplantes, já foram descritos remodelamentos na expressão e deposição das proteínas de matriz extracelular nos tecidos transplantados, que podem ser correlacionado com o grau de inflamação, fibrose e rejeição do aloenxerto (53-56).

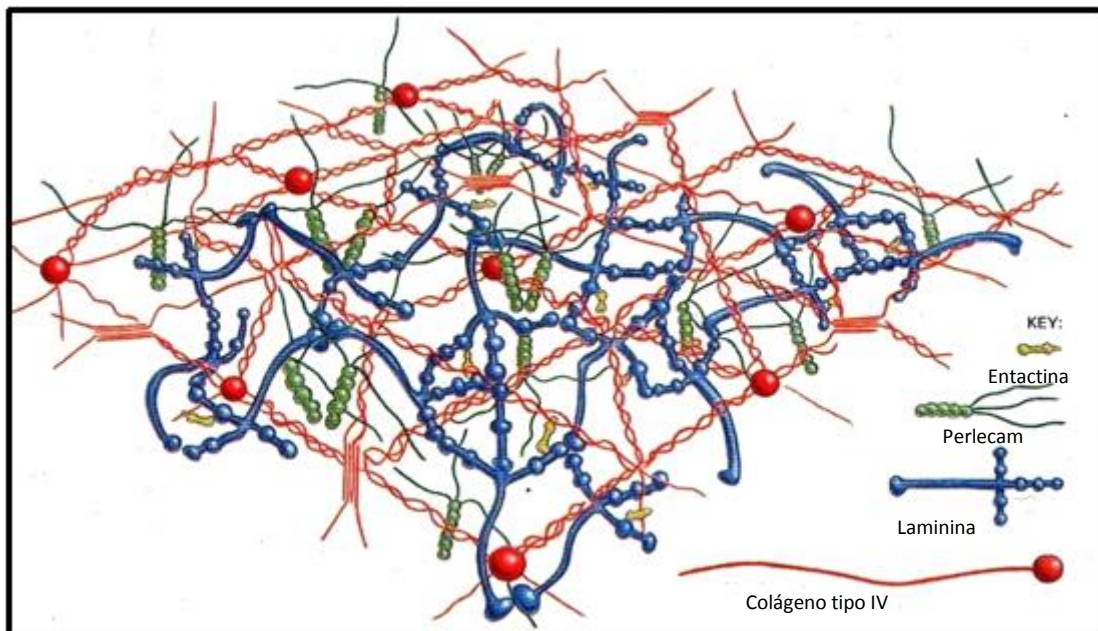


Figura 1.5. – Rede formada por proteínas da matriz extracelular. (Alberts, B.,2002). Proteínas da matriz extracelular, como, entactina, perlecan, laminina, colágeno, se associam formando uma rede de matriz extracelular.

1.6- Laminina

A Laminina (LM) é a primeira proteína de ECM a ser detectada durante a embriogênese, sendo um dos principais constituintes das membranas basais (37), e será a principal molécula da ECM a ser abordada nesse estudo. São moléculas que compreendem uma família de glicoproteínas cruciformes, e desempenham diversas funções fisiológicas essenciais, possuindo um papel importante na organogênese, no desenvolvimento embrionário e na manutenção dos tecidos (57), além de serem fundamentais para a adesão, migração e diferenciação celular (58). São heterotrímeros constituídos de uma cadeia alfa, uma beta e uma gama. Os trímeros são denominados de acordo com a composição das cadeias, por exemplo, LM 111 é composta pelas cadeias alfa1 (LAMA1), beta1 (LAMB1) e gama1 (LAMC1) (Fig.1.6)

(57). Nos vertebrados foram identificadas cinco cadeias do tipo alfa, três do tipo beta, e três do tipo gama (37).

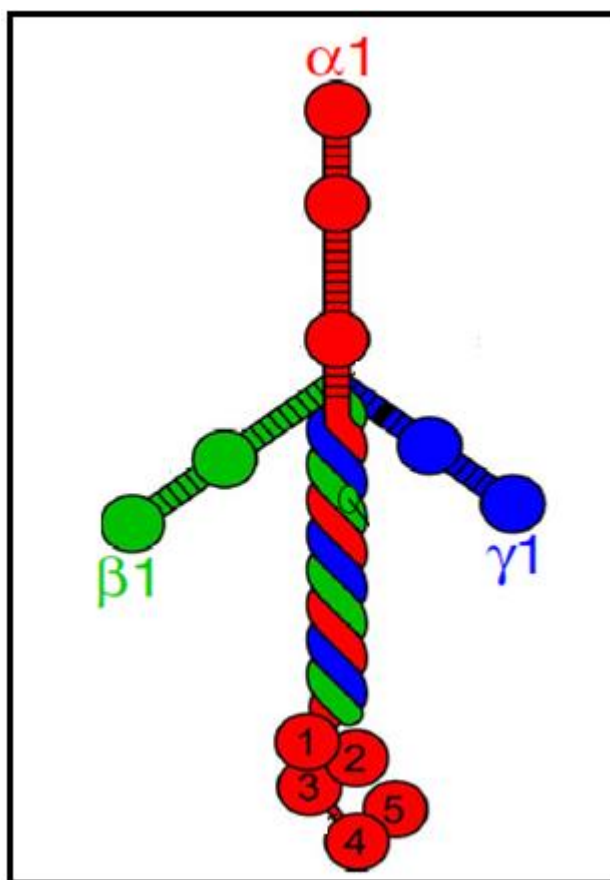


Figura 1.6. Estrutura da LM 111. Adaptado de Durbeej, M., 2010.

A primeira isoforma de LM descrita foi a LM111, há mais de 30 anos (59). Atualmente já estão descritas 18 isoformas de LM (Fig.1.4.1) que são expressas diferencialmente em diversos tecidos do organismo, como por exemplo, a isoforma 221, já foi identificada no tecido muscular, coração, nervo periférico e junções neuromusculares, ao passo que a isoforma 332 foi detectada na pele, epiderme, placenta, glândulas mamárias, útero e pulmão (57). Particularmente no sistema imune, as moléculas de LM estão envolvidas em processos de diferenciação, adesão, migração e ativação de linfócitos (39, 60).

Além da expressão diferencial, diversos estudos vêm demonstrando uma variedade de funções dessas isoformas. A LM411 já foi descrita desempenhando um importante papel na transmigração de neutrófilos para o sítio inflamatório, enquanto a LM511 estimulou de maneira significativa a adesão dessas células (61). Além

disso, as duas isoformas foram capazes de estimular a proliferação de células T *in vitro* (38). Outro estudo verificou uma indução da mielinização das células de Schwann, em modelos de ratos deficientes para LM e tratados com a isoforma 211 recombinante (62). A LM332, por exemplo, já foi descrita ser importante para a migração de células tumorais, sendo que o silenciamento do gene LAMB3, que codifica a cadeia beta3 que constitui a LM332, reduziu a migração e invasão de células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço e carcinoma cervical (63, 64).

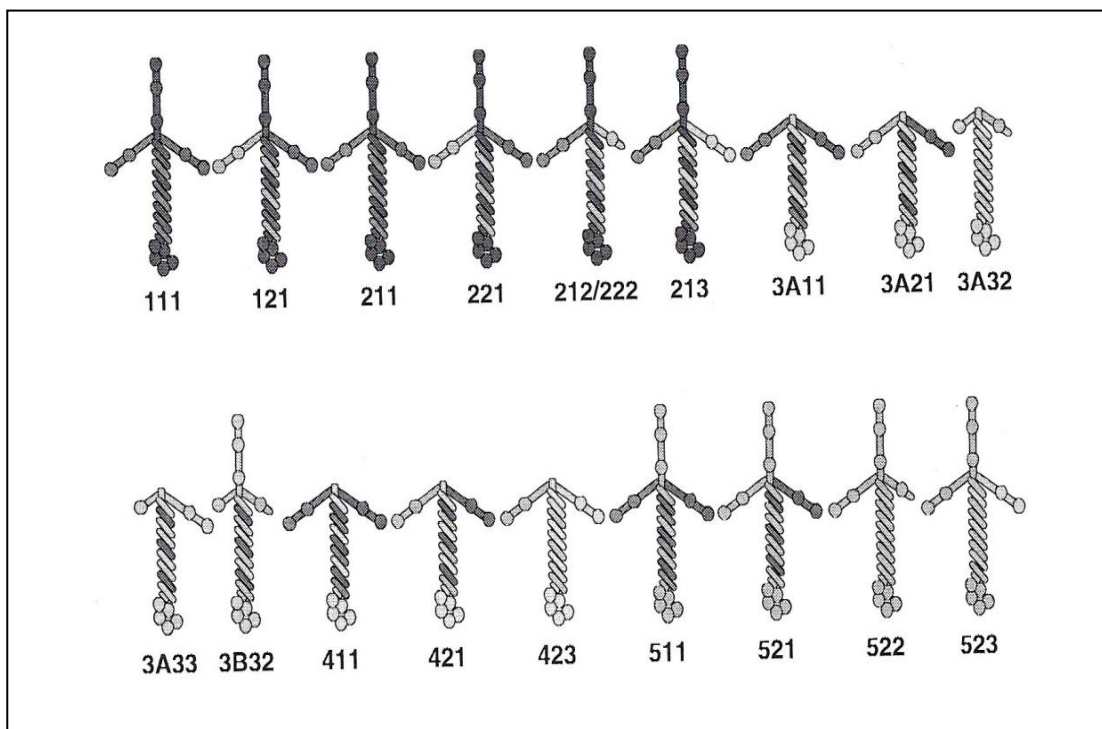


Figura 1.6. Isoformas de Laminina. (Durbeej, M., 2010).

As interações das células com as LMs são mediadas por vários receptores de membrana classificados como receptores não-integrinas e receptores de tipo integrina, os quais desempenham um papel central na adesão e funções das LMs. As integrinas são heterodímeros formados por uma cadeia alfa e uma beta, e são consideradas os principais receptores de adesão capazes de integrar o sinal extracelular com o citoesqueleto (sinalização *outside-in*), modulando também os mecanismos de transdução de sinal intracelular, interagindo cooperativamente ou sinergicamente com outros receptores de membrana (sinalização *inside-out*). Até o momento, 24 sub-tipos de integrinas foram identificados em mamíferos (65, 66). Vários destes apresentam capacidade de se ligar à LM (67). Atualmente,

identificaram-se como principais receptores, com alta afinidade com as lamininas, as integrinas $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, (68-70).

As $\beta 1$ -integrinas são também conhecidas como a subfamília VLA (“very late antigen”), pelo fato de os primeiros membros descritos da subfamília serem antígenos de aparecimento tardio após ativação de linfócitos T *in vitro*. Estas integrinas são expressas em diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, leucócitos, plaquetas, miócitos, células endoteliais e diversas células epiteliais (71, 72).

2- Justificativa e objetivos

Em 1991, Maria de Sousa e colaboradores descreveram a importância da ECM para a migração e posicionamento de linfócitos na rejeição de transplantes. Neste trabalho, os autores os autores sugerem que, além do enxerto possuir antígenos (principalmente as moléculas de MHC) que irão estimular os linfócitos T do hospedeiro, este, carrega também proteínas da ECM, que podem ter forte influência na resposta T específica, aumentando a complexidade desta resposta(50). Dessa forma, é possível que a ECM que esteja presente no tecido enxertado possa contribuir para a forte resposta imune que é observada na rejeição de transplantes, e que ainda é um grande problema de saúde pública no mundo.

Especificamente no processo de rejeição de transplantes, as proteínas da ECM, principalmente LM e fibronectina, podem ser consideradas participantes ativas e importantes na resposta imune do hospedeiro, levando à rejeição e podendo agir como um sinal de atração para as células que estão migrando para o sítio de rejeição. Em um modelo de rejeição acelerada de aloenxertos cardíacos em ratos previamente sensibilizados ao antígenos do doador, foi demonstrado aumento de fibronectina e laminina na área do enxerto, que precedeu o infiltrado celular, o qual por sua vez, se localizou em áreas ricas em fibronectina (73).

Em um modelo de transplante cardíaco, descrito originalmente por Fulmer e colaboradores (74), verificou-se que, quando corações isogênicos de um animal recém-nato eram enxertados na orelha de camundongos adulto-jovens cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi*, ocorria rejeição dependente de células T CD4⁺ (75). Neste mesmo modelo, foi demonstrado pelo nosso grupo, que o tratamento com anticorpos monoclonais anti-LM ou anti-receptor de LM foi capaz de inibir a rejeição dos corações isogênicos, sugerindo que as interações receptor-ECM possam estar envolvidas no processo de influxo de células T CD4⁺ autorreativas envolvidas na destruição do miocárdio (76).

Com base no mesmo modelo, utilizando, porém, enxertos alogênicos, nosso grupo verificou um aumento do infiltrado inflamatório (macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) e da deposição de proteínas da ECM (colágeno do tipo IV, fibronectina e LM) durante a cinética de rejeição, com o pico no décimo quinto (15^o) dia. Além disso, verificamos uma clara colocalização da deposição da ECM com o infiltrado celular durante a cinética de rejeição (77). Posteriormente verificamos que a injeção

do anticorpo anti-LM, na região adjacente ao transplante, diminuiu o infiltrado celular, assim como a deposição de proteínas da ECM, reforçando a importância da ECM, particularmente da LM, no processo de migração do infiltrado em direção ao aloenxerto (78).

Atualmente, várias isoformas de LM foram descritas, com função e distribuição tecidual distintas. Porém, em vários sistemas biológicos, em diversas patologias e também na rejeição de transplantes, a função dessas diferentes isoformas não foi estudada. Além disso, quando demonstramos que o tratamento anti-LM reduziu o processo inflamatório da rejeição (78), as isoformas de LM que poderiam ser bloqueadas pelo anticorpo monoclonal não foram identificadas.

2.1- Objetivo geral

Consideramos que faz-se necessário compreender o papel biológico das diferentes isoformas de LM no processo de rejeição de transplantes, assim, o objetivo geral deste trabalho é o de identificar quais as isoformas de LM poderiam modular a migração dos linfócitos T alorreativos.

2.1.1- Objetivos específicos

- Caracterizar os linfócitos envolvidos na rejeição, analisando os enxertos e os linfonodos de drenagem;
- Analisar a expressão de isoformas das cadeias de LM nos enxertos cardíacos e sua possível colocalização com o infiltrado celular;
- Analisar a capacidade migratória *ex vivo* dos linfócitos T frente às isoformas de laminina com expressão relevante nos enxertos durante o pico de rejeição.

3- Metodologia

3.1- Animais

Utilizamos camundongos BALB/c machos com idade variando de 3 a 4 semanas e camundongos BALB/c e C57BL/6 recém-natos de até um dia obtidos junto ao Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). Os procedimentos envolvendo experimentação animal foram avaliados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fiocruz, sendo aprovados com o protocolo LW-7/09.

3.2- Técnica do transplante cardíaco

Os transplantes de coração no tecido subcutâneo de orelhas de camundongos foram realizados de acordo com metodologia anteriormente descrita (75), e que corresponde a uma adaptação do método originalmente descrito por Fulmer (74). Nesse modelo, camundongos C57BL/6 ou BALB/c recém-natos (0 a 24 horas de vida) foram utilizados como doadores do órgão. Os corações obtidos desses animais, depois de retirados, foram rapidamente passados para uma solução salina estéril (PBS pH 7.2) e em seguida transplantados na orelha de receptores BALB/c adultos. Nos camundongos receptores, foi feita uma pequena incisão de aproximadamente 0,5 cm na epiderme, transversal ao eixo longitudinal da base dorsal da orelha. As duas bordas de pele foram afastadas, com auxílio de uma pinça, e o órgão inserido na pequena bolsa que se forma no tecido subcutâneo da orelha do receptor. O fechamento da área de incisão é feito apenas por compressão usando pinça anatômica. Os camundongos permaneceram por 15 dias em ambiente estéril, até serem feitas as análises. Os grupos isogênico e alogênico são constituídos por camundongos receptores BALB/c e, respectivamente, doadores BALB/c e C57BL/6.

3.3- Fenotipagem dos linfócitos T

Para uma caracterização da população linfocitária e da expressão de marcadores de ativação, tanto no enxerto quanto nas células dos linfonodos de drenagem, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Os linfócitos foram obtidos dos linfonodos e dos enxertos, após maceração desses tecidos em homogeneizador do tipo “potter”, e logo em seguida foram contados em câmara de Neubauer e então essas células foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD4 APC-Alexa 750 (1:100), anti-CD8 PercP (1:25), anti-CD44 FITC (1:25), anti-CD62L PE-Cy7 (1:50), anti-CD3 APC (1:50) (BD Pharmingen). O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com soro de camundongo e, após marcação com os anticorpos, as células foram fixadas com formaldeído 1%, adquiridas em um citômetro de fluxo FACS Canto II e analisadas com o software BD FACS DIVA. Todas as análises foram feitas dentro da região dos linfócitos.

A definição das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e dos perfis de ativação nos linfonodos e enxertos foram feitas da seguinte maneira: a região da população de linfócitos T foi definida pelo padrão de tamanho e granulosidade, em seguida as células CD3⁺ foram selecionadas, então, dentro da região de linfócitos CD3⁺ as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ foram selecionadas e, por fim, dentro da região de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, o perfil de ativação foi determinado através da análise concomitante dos marcadores CD44 e CD62L (as células CD44^{Hi}CD62L^{Low/neg}, com alta expressão membranar de CD44 e baixa ou nenhuma de CD62L, foram consideradas ativadas) (Fig.3.3).

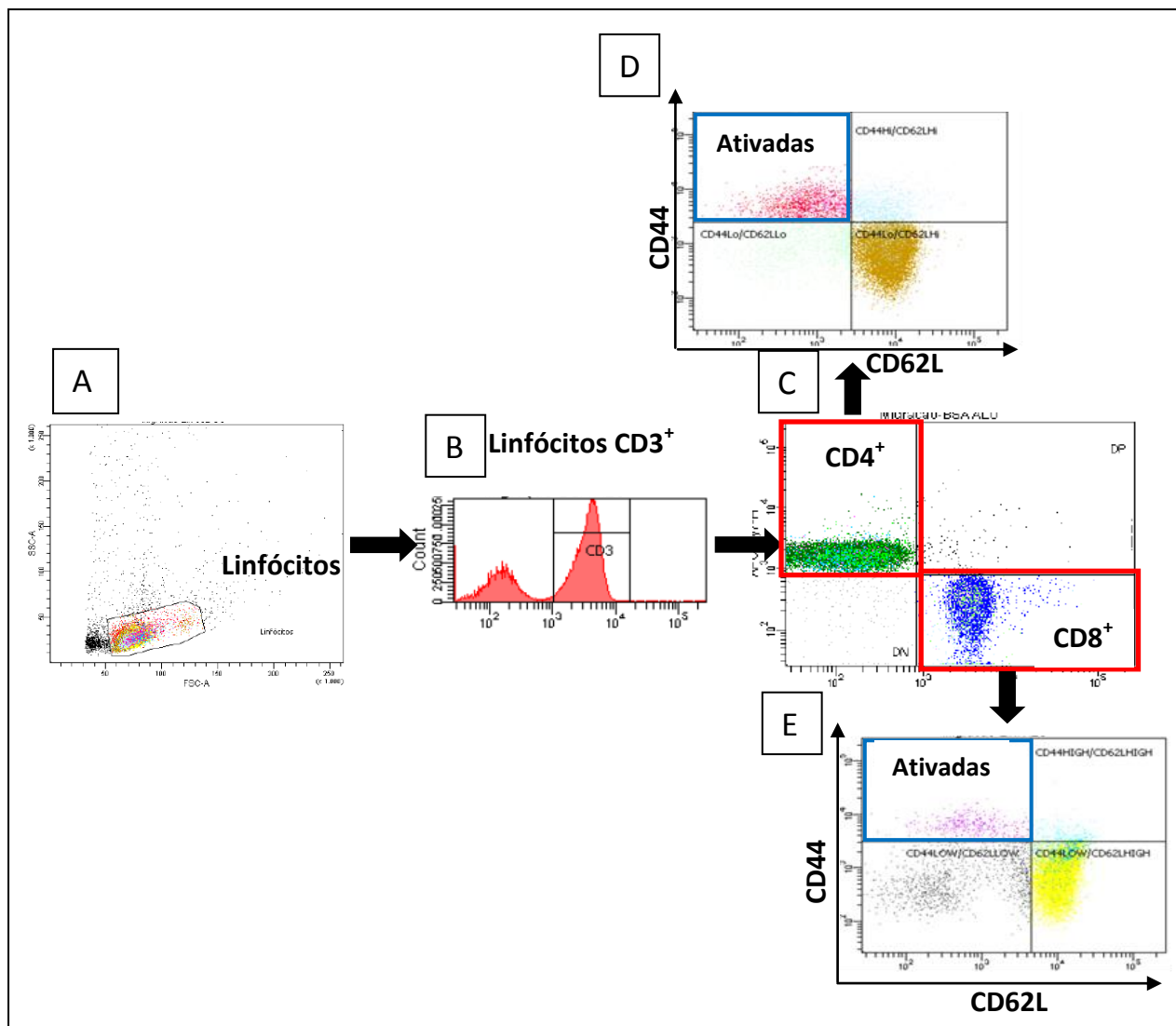


Fig.3.3- Definição das populações de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e ativados. A) Definição da região de linfócitos. B) Linfócitos T CD3⁺. C) Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ selecionados dentro da região de células CD3⁺. D) Dot plot de linfócitos CD44^{Hi} e CD62L^{Low/neg} selecionados na região de linfócitos T CD4⁺. E) Dot-plot de linfócitos CD44^{Hi} e CD62L^{Low/neg} selecionados na região de linfócitos T CD8⁺.

3.4- Análise da expressão das cadeias de LM por PCR em tempo real

Para as análises da expressão gênica das cadeias de LM, os corações isogênicos e allogênicos transplantados foram recolhidos no décimo-quinto dia após o transplante, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A purificação total do RNA foi feita com trizol e, em seguida, o mRNA extraído foi tratado com DNase e

quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific). O cDNA foi sintetizado com Superscript® First-Strand (Invitrogen), foi utilizado SyberGreen® PCR Master Mix (Applied Biosystems), e a PCR em tempo real foi realizada em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os dados foram analisados com o programa Real-time PCR miner (79). Os “primers” utilizados, incluindo os genes constitutivos GAPDH e o HPRT (empregados como controle) estão descritos na tabela 3.4.

Gene	Sequência do “primer”	Cadeia	Isoformas de LM
LAMA1 (F)	AGTGCCTGTGAGCGAGCACG	Alfa 1	111; 121
LAMA1 (R)	CAGGGAACAAGCCTCTCTGCTGG		
LAMA2 (F)	AGCTGTAAGGAGAATGTTGAAGGTG	Alfa 2	211; 221; 212/222; 213
LAMA2 (R)	TGCAAGTTGAAGAAACCAGATTTGC		
LAMA3 (F)	CACCTGCCTCACTGTTTCATAG	Alfa 3	311; 321; 332; 333
LAMA3 (R)	ACATCGCAAGTCAATCTGGAG		
LAMA4 (F)	TGGTCGGCAGGCAAGACCCA	Alfa 4	411; 421; 423
LAMA4 (R)	CCGCTGGCAGTGCAGACAGAAT		
LAMA5 (F)	GCCCTACTTCAACCTGGCGGA	Alfa 5	511; 521; 522; 523
LAMA5 (R)	CAGTACTGGCCCTGGATTGTCT		
LAMB1 (F)	TCGACTCGCTTGTTCTCATGCC	Beta 1	111; 211; 212; 213; 311; 411; 511
LAMB1 (R)	CCTGAGCCGCCAACAGTGAAG		
LAMB2 (F)	TGCTGAGGGCATGGTACACG	Beta 2	121; 221; 222; 321; 421; 423; 521; 522; 523
LAMB2 (R)	TGCTCACAGTTGAGTCCACGAG		
LAMB3 (F)	ATGATGTGAGCCCTGTCTCTCTGC	Beta 3	332; 333;
LAMB3 (R)	GCTGCATCCTCTTGTCTAGGTCC		
LAMC1 (F)	CAAACCTCGTTCTTTACACACTCG	Gama 1	111; 121; 211; 221; 311; 321; 411; 421; 511; 521
LAMC1 (R)	ACCCCAAAGTTCTCAAGTCTTAC		
LAMC2 (F)	TCCTTTCAGGTGGAAGCAAAGAGG	Gama 2	222; 332; 522
LAMC2 (R)	CACCAGGTTTGAGAGAGAATCAGCC		
GAPDH (F)	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	-	-
GAPDH (R)	TTGCTCAGTGTCTTGTCTGGGGT		
HPRT (F)	TCCCAGCGTCGTGATTAGCGATG	-	-
HPRT (R)	GGCCACAATGTGATGGCCTCCC		

Tabela 3.4 – Descrição dos “primers” utilizados. (F): do inglês, “Forward”; (R): do inglês, “Reverse”

3.5- Análise da deposição de LM111, LM332, LAMA1 e LAMB3

Uma análise qualitativa da deposição das cadeias e isoformas de LM foi realizada através da técnica de imuno-histoquímica do tipo imunofluorescência. Para tal, os linfonodos foram congelados diretamente em gelo seco e os enxertos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, para uma melhor preservação do tecido muscular cardíaco. Em criostato, cortes de 5 μm foram feitos desses tecidos, em seguida fixados por 5 minutos em acetona, bloqueados com PBS/BSA 1% por 20 minutos e, então, marcados com anticorpo anti-LM332 (Abcam), anti-LM111 (Novotec), anti-LAMA1 (R&D Systems) e anti-LAMB3 (Thermo scientific) “overnight”. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados por 45 minutos com o anticorpo secundário Alexa 488 (Invitrogen), na diluição de 1:800. As imagens obtidas em microscópio de fluorescência ZEISS AXIO IMAGER A2 foram quantificadas com o software Image J (NIH).

3.6- Ensaio de quimiotaxia

Para verificarmos o efeito da LM sobre a migração dos linfócitos de animais controles e transplantados em ensaio funcional, realizamos experimentos de transmigração, utilizando-se câmaras de Transwell® com poros de 5 μm (Costar). Tais ensaios consistem na colocação de $2,5 \times 10^6$ células obtidas dos linfonodos de drenagem, após maceração, sobre os insertos da câmara previamente recobertos com moléculas de LM111(Sigma), LM332 (Biolamina) ou BSA (albumina de soro bovino) (Sigma) como controle para a normalização da migração (incubação por 1h na estufa de CO₂ a 37°C). Em seguida, as câmaras foram incubadas por 3 horas a 37°C, e as células que migraram para a parte inferior foram contadas, marcadas com anticorpos monoclonais para as moléculas CD3, CD4, CD8, CD44 e CD62L, e analisadas por citometria de fluxo (conforme descrição na seção 3.3).

3.7- Análises estatísticas

Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o método ANOVA (experimentos com 3 grupos a serem analisados – controle, isogênico e alogênico) e t de Student (experimentos com 2 grupos a serem

analisados – isogênico e alogênico). Diferenças revelando um valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4- Resultados

4.1- Análise dos linfonodos de drenagem

De acordo com estudos anteriores do nosso grupo, o 15º dia pós-transplante apresentou um intenso infiltrado inflamatório nos aloenxertos, caracterizando o pico da rejeição nesse modelo (56, 78). Sendo assim, nossas análises de caracterização dos linfócitos envolvidos no processo de rejeição foram realizadas nesse dia.

Com a finalidade de entender um pouco mais a respeito dos linfócitos envolvidos durante o processo de rejeição no nosso modelo, decidimos analisar os linfonodos de drenagem, local onde os linfócitos T antígeno-específicos são ativados e se tornam efetores (3). Inicialmente, para definir quais os linfonodos estavam drenando especificamente os enxertos cardíacos transplantados nas orelhas dos camundongos receptores, injetamos nanquim na área do enxerto no 14º dia pós-transplante e os animais foram eutanasiados no 15º dia. Com essa estratégia identificamos os linfonodos cervicais como os linfonodos drenantes.

4.1.1- Tamanho e celularidade dos linfonodos de drenagem

Ao iniciar as análises dos linfonodos de drenagem, observamos um claro aumento do tamanho (Fig.4.1.1A) e da celularidade (Fig.4.1.1B) dos linfonodos cervicais dos animais com transplante cardíaco alogênico quando comparados ao grupo isogênico e ao grupo controle.

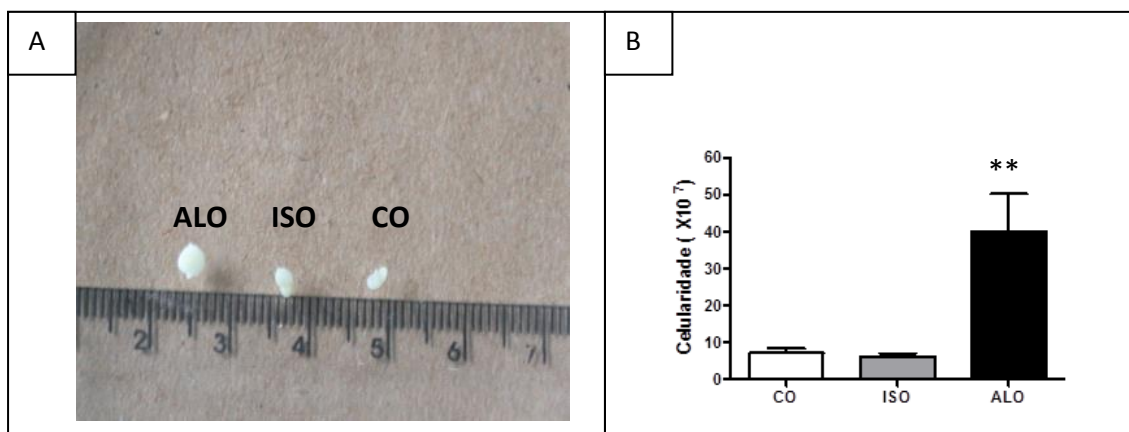


Fig.4.1- Linfonodos cervicais. A) Tamanho dos linfonodos cervicais (drenagem). Linfonodos representativos de 6 experimentos, em cada experimento usamos 5 animais de cada grupo. Em cada camundongo há dois linfonodos cervicais. B) Número absoluto de linfócitos presentes nos linfonodos de drenagem. Os dados se referem ao “pool” dos linfonodos cervicais (dois linfonodos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez linfonodos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 6 experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CO: controle, ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.1.2- Caracterização das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes nos linfonodos de drenagem

Após verificarmos um aumento na celularidade dos linfonodos cervicais dos animais alotransplantados, decidimos investigar se o aumento era devido a uma maior frequência de linfócitos T, visto que essas células desempenham um papel central durante o processo de rejeição (3, 11-13). Assim, decidimos focar o estudo nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e observamos um aumento nos números absolutos de ambos os grupos celulares nos linfonodos cervicais dos animais que receberam o transplante cardíaco alogênico (Fig.4.1.2B). Porém, os percentuais dessas subpopulações permaneceram inalterados (Fig.4.1.2A).

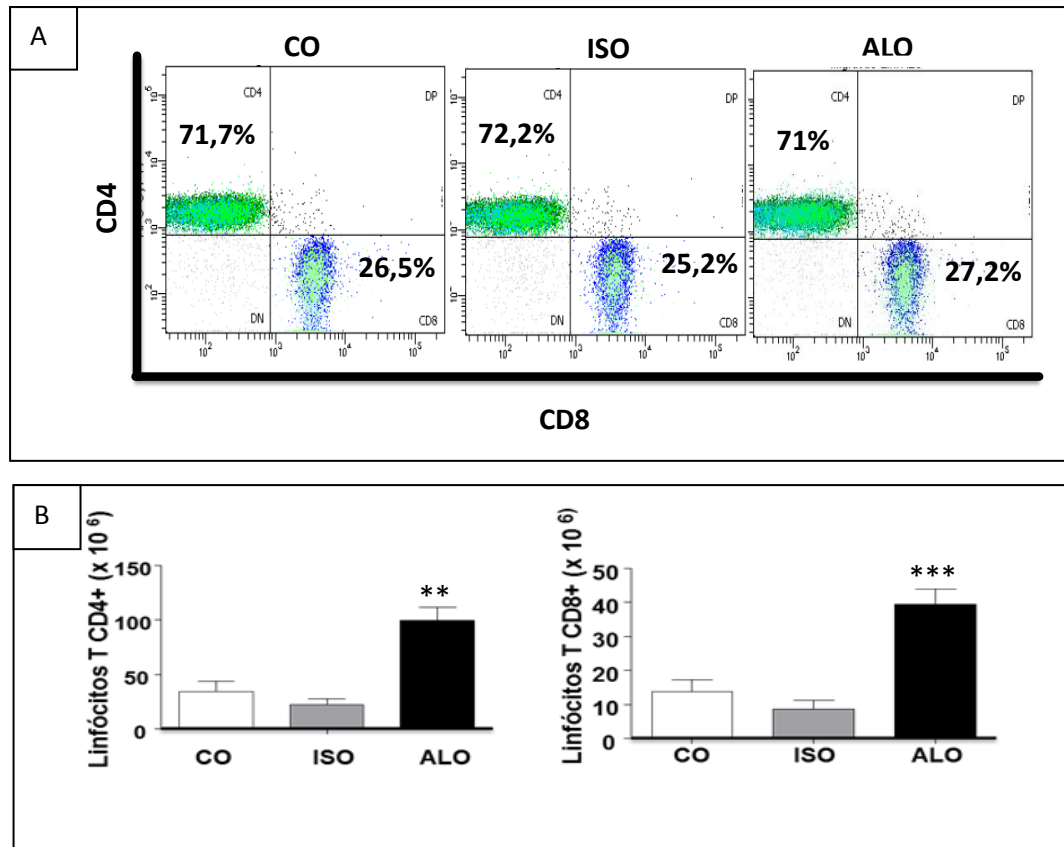


Fig.4.1.2- Aumento no número absoluto de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos de drenagem dos animais com transplante cardíaco alogênico. A) Dot plot representativo mostrando o percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos de drenagem. B) Números absolutos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos de drenagem. Os dados se referem ao “pool” dos linfonodos cervicais (dois linfonodos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez linfonodos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 5 experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CO: controle, ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.1.3- Análise do perfil de ativação das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos linfonodos de drenagem

No processo de rejeição, linfócitos T aloespecíficos são ativados nos linfonodos de drenagem (8-10), sendo assim, analisamos o perfil de ativação dos linfócitos T nesses órgãos linfoides. As moléculas utilizadas como marcadores de ativação foram: a molécula CD62L, a L-selectina expressa por linfócitos T virgens, cuja expressão é perdida após a ativação; e a molécula CD44, ligante de ácido

hialurônico que é expressa em alta densidade por linfócitos T após ativação (80-82). Sendo assim, consideramos ativados os linfócitos que apresentam o fenótipo $CD44^{Hi}CD62L^{Low/neg}$, conforme descrito na seção 3.3.

Ao analisarmos o perfil de ativação desses linfócitos, observamos um aumento de aproximadamente três vezes, nos números absolutos de linfócitos T $CD4^+$ ativados (Fig.4.1.3A) e um aumento ainda maior, cerca de 15 vezes, de $CD8^+$ ativados (Fig.4.1.3B) nos linfonodos de drenagem dos camundongos aloenxertados.

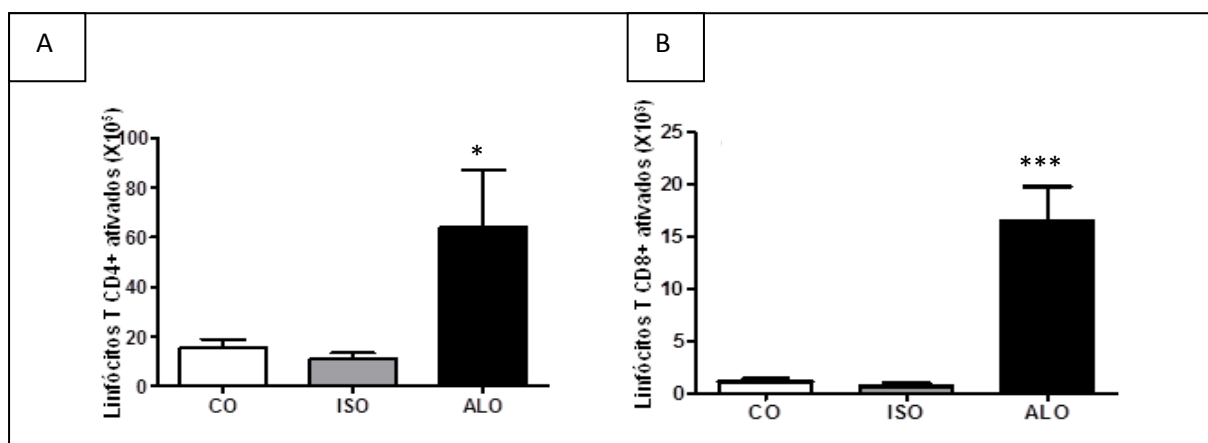


Fig.4.1.3- Aumento nos números absolutos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados ($CD44^{Hi}CD62L^{Low/neg}$) nos linfonodos de drenagem de camundongos com transplante alogênico. A) Números absolutos de linfócitos T $CD4^+$ ativados. B) Números absolutos de linfócitos T $CD8^+$ ativados. Os dados se referem ao “pool” dos linfonodos cervicais (dois linfonodos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez linfonodos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 5 experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CO: controle, ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.1.4- Análise da deposição de LM111 nos linfonodos de drenagem

Recentemente, foi demonstrado que linfonodos apresentam uma expressão tecidual finamente regulada de isoformas de LM (38), e sabe-se que proteínas da ECM podem ter sua expressão modulada em situações patológicas (83-84). Assim, decidimos investigar se as alterações na celularidade e no perfil de ativação dos linfócitos T em linfonodos de animais com transplantes alogênicos estariam correlacionadas com diferenças na deposição de LM.

Ao analisarmos a deposição de LM, utilizando o anticorpo policlonal para a LM111, verificamos que não houve uma diferença qualitativa e quantitativa na rede tecidual dessa isoforma de LM nos três órgãos analisados (dado não mostrado). Porém, uma análise mais detalhada mostrou um aumento da deposição da LM na parede dos vasos presentes nos linfonodos dos animais com transplante alogênico, quando comparado com os grupos controle e isogênico (Fig. 4.1.4).

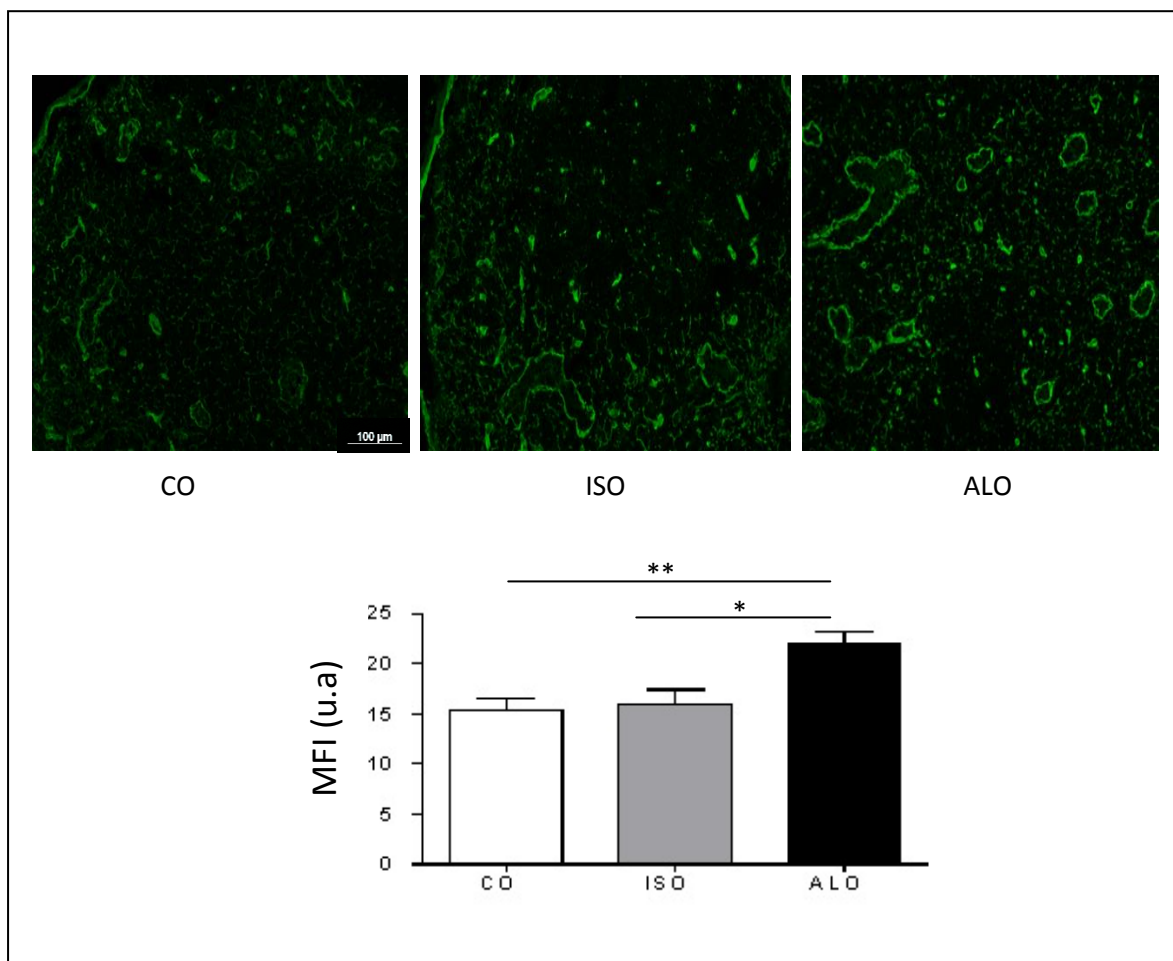


Fig.4.1.4. Deposição de laminina na membrana basal dos vasos presentes nos linfonodos de drenagem dos animais controles, isogênicos e alogênicos. Imagens representativas mostrando a expressão de LM (verde) nos linfonodos de drenagem dos animais controle, isogênico e alogênico por imunofluorescência utilizando anticorpo policlonal anti-LM111. O gráfico demonstra a média de intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, da marcação de LM na membrana basal dos vasos presentes nos linfonodos de drenagem dos camundongos controles e transplantados. Foram quantificadas 10 regiões de cada linfonodo, em um total de 4 linfonodos. Resultados expressos como a média + SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CO: controle, ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2- Análise dos enxertos cardíacos

Uma vez caracterizados os linfonodos de drenagem quanto ao fenótipo de ativação de linfócitos T e também da deposição de LM, buscamos analisar o sítio efetor da resposta alorreativa.

4.2.1- Aspecto macroscópico e número de linfócitos do infiltrado inflamatório dos enxertos cardíacos

Dados anteriores do nosso grupo (78), que foram confirmados também neste trabalho, demonstraram um aumento do edema e do eritema nas orelhas dos camundongos que receberam o transplante alogênico, quando comparado ao controle isogênico (Fig.4.2.1A), o que caracteriza a presença de uma resposta inflamatória durante o processo de rejeição a aloenxertos. Quando analisamos o infiltrado inflamatório presente nos enxertos, verificamos um aumento no número total de células presentes no infiltrado dos enxertos alogênicos, quando comparado com os enxertos isogênicos (Fig.4.2.1B).

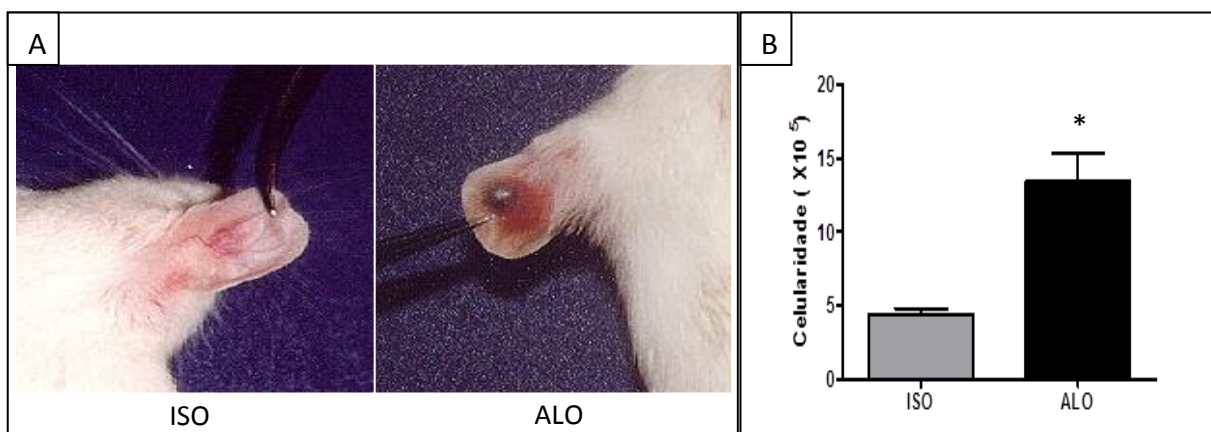


Fig.4.2- Enxertos cardíacos transplantados na orelha dos camundongos adultos. A) Camundongos com transplante cardíaco isogênico e alogênico na orelha (78). B) Número absoluto de células presentes nos enxertos cardíacos. Os dados se referem ao “pool” dos enxertos cardíacos (dois enxertos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez enxertos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 5 experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2.2- Caracterização das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes no infiltrado inflamatório

Considerando a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ na destruição do enxerto (8-10) e o importante papel auxiliar dos linfócitos T CD4⁺ em orquestrar e iniciar a resposta na rejeição (11-13), julgamos relevante analisar essas populações no infiltrado inflamatório observado no pico da rejeição do transplante. Ao analisar por citometria de fluxo o infiltrado inflamatório, identificamos um aumento significativo no percentual e números absolutos de linfócitos T CD8⁺ (aumento de 15 vezes em relação ao isogênico) e um aumento nos números absolutos de linfócitos T CD4⁺ (aumento de 4 vezes em relação ao isogênico) (Fig.4.2.2A-B).

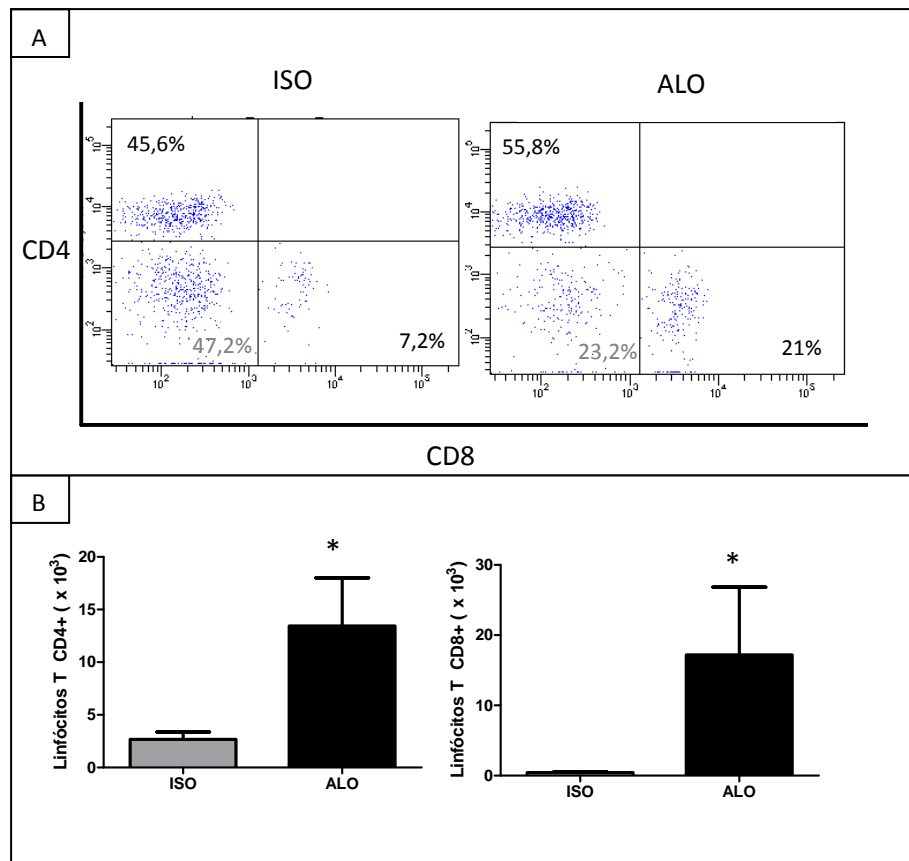


Fig.4.2.2. Enriquecimento de linfócitos T CD8⁺ no infiltrado inflamatório presente nos enxertos alogênicos. A) Dot-plot representativo do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos enxertos cardíacos. B) Números absolutos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Os dados se referem ao “pool” dos enxertos cardíacos (dois enxertos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez enxertos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 4 experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2.3- Perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes no infiltrado inflamatório dos enxertos cardíacos

No processo de rejeição, as células ativadas nos linfonodos de drenagem migram em direção ao enxerto e assim podem desempenhar suas funções efetoras (3). Como os linfócitos T ativados são essenciais para a rejeição, fizemos uma análise do perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes no infiltrado inflamatório. Ao estudar as subpopulações, verificamos que houve um aumento significativo no percentual (Fig.4.2.3A e 4.2.3B) e nos números absolutos (4.2.3C e 4.2.3D) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados (definidos pelo fenótipo CD44^{Hi}CD62L^{Low/neg}, conforme descrito na seção 3.3) no grupo alogênico, quando comparados com o grupo de animais que receberam o transplante isogênico.

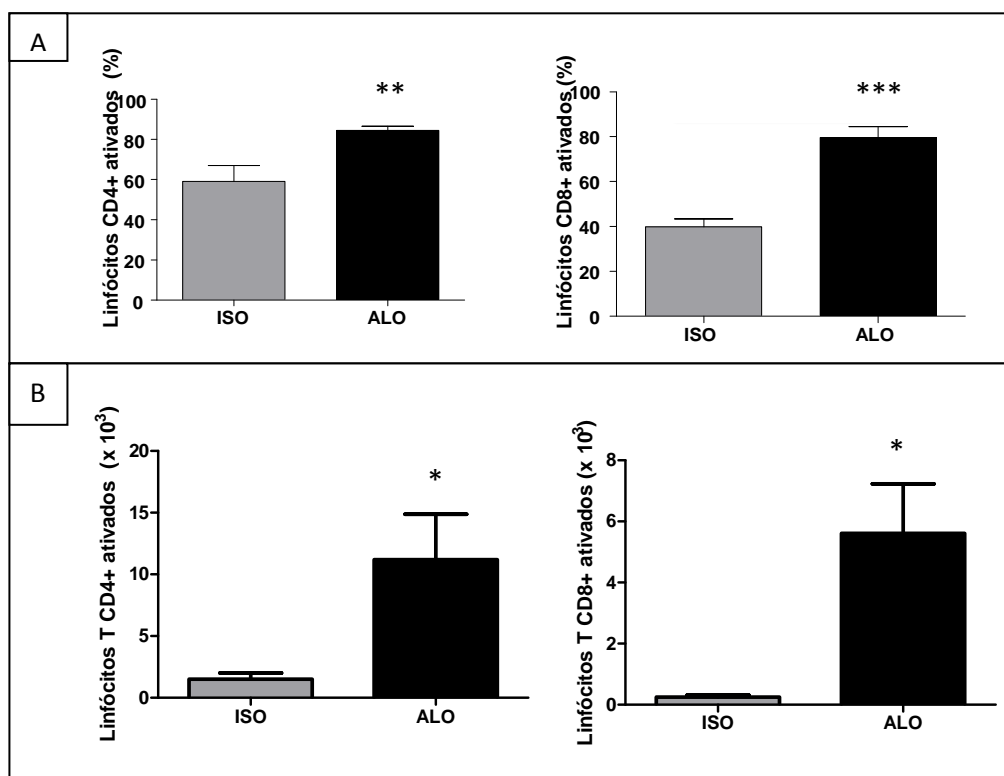


Fig.4.2.3. Aloenxertos apresentam um aumento no percentual e números absolutos de linfócitos T ativados. A) Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados nos aloenxertos. B) Números absolutos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados nos aloenxertos. Os dados se referem ao “pool” dos enxertos cardíacos (dois enxertos por camundongo) de cinco animais, totalizando dez enxertos em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 4 experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2.4- Expressão das cadeias de laminina nos enxertos cardíacos

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, no mesmo modelo aqui utilizado, foi demonstrado um aumento da expressão de LM, e após tratamento com anti-LM verificou-se uma diminuição da rejeição (77). Porém, neste trabalho, não foram identificadas as isoformas de LM envolvidas no processo de rejeição, além de não ter sido feita uma comparação da modulação da LM com o grupo isogênico. Dessa forma, decidimos identificar as isoformas presentes no 15º dia e verificar se haveria alguma modulação na expressão das isoformas de LM nos enxertos cardíacos alogênicos comparados com os isogênicos durante o pico da rejeição.

Com o intuito de verificar a expressão das cadeias de LM nos enxertos cardíacos, utilizamos a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Observamos uma não modulação e uma diminuição na expressão da maioria dos genes das cadeias da molécula de LM nos enxertos alogênicos quando comparados aos isogênicos (Fig.4.2.4). De forma interessante, dos genes analisados, somente o que codifica a cadeia LAMB3 teve uma maior expressão nos enxertos alogênicos (Fig.4.2.4).

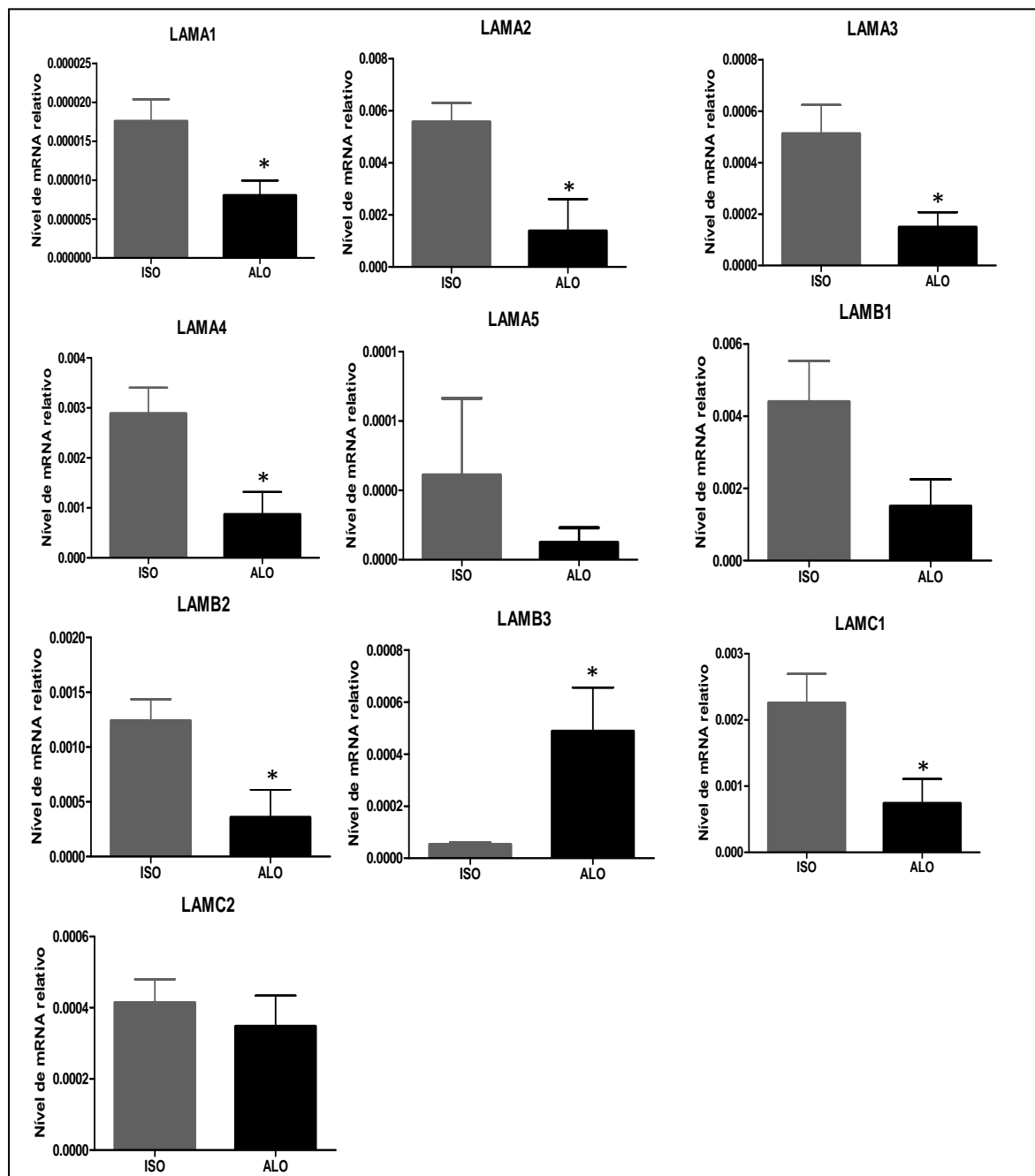
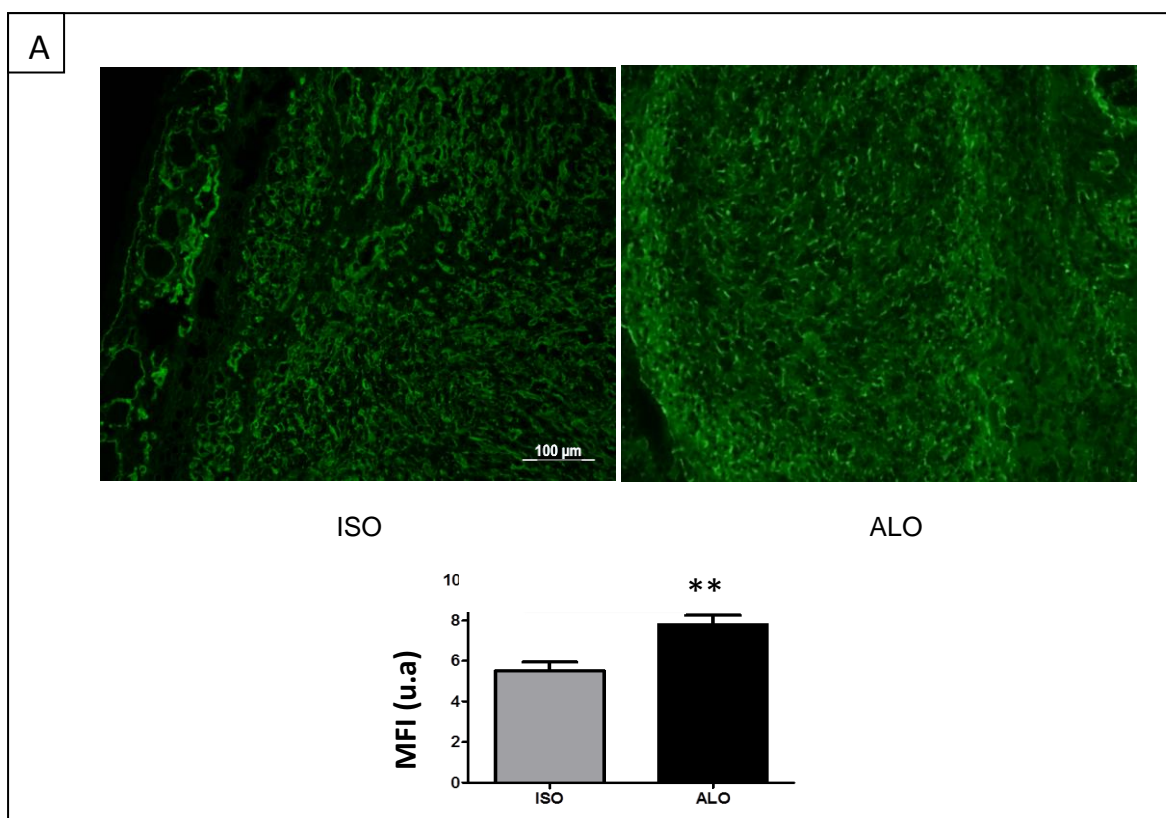


Fig.4.2.4- Aumento na expressão da cadeia beta3 da molécula de LM por PCR em tempo real nos enxertos cardíacos. Gráficos expressos em nível de mRNA relativo das cadeias de LM. Os dados se referem ao “pool” de dois enxertos cardíacos, do mesmo camundongo, em cada experimento. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 5 experimentos. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 ISO: Isogênico, ALO: Alogênico.

4.2.5- Deposição da isoforma LM111 e da cadeia LAMA1 nos enxertos cardíacos

A análise por qPCR demonstrou uma modulação de várias cadeias de LM durante o pico do processo de rejeição dos enxertos cardíacos alogênicos, incluindo das cadeias LAMA1, LAMB1 e LAMC1, constituintes da isoforma LM111. Tendo em vista que nossos resultados anteriores (77) demonstraram uma grande deposição de LM nos aloenxertos, baseados na utilização de anticorpo policlonal produzido para a LM111(56), e que tratamento com um anticorpo monoclonal anti-LM111 leva à redução do processo de rejeição (78), decidimos investigar especificamente a deposição da cadeia LAMA1 da isoforma LM111 nos enxertos cardíacos. Em uma primeira análise com anticorpo policlonal para a LM, corroborando nossos resultados anteriores (verificamos um aumento significativo da deposição desta molécula nos aloenxertos, quando comparado aos controles isogênicos (Fig.4.2.5A). Analisando-se especificamente a cadeia LAMA1, observamos uma redução da deposição desta molécula nos enxertos cardíacos alogênicos (Fig.4.2.5B), corroborando nossos dados de qPCR e dados anteriores que demonstraram a presença da LM111 (77, 85). Esses dados indicam que, possivelmente, outras isoformas de LM possam estar aumentadas nos enxertos cardíacos alogênicos.



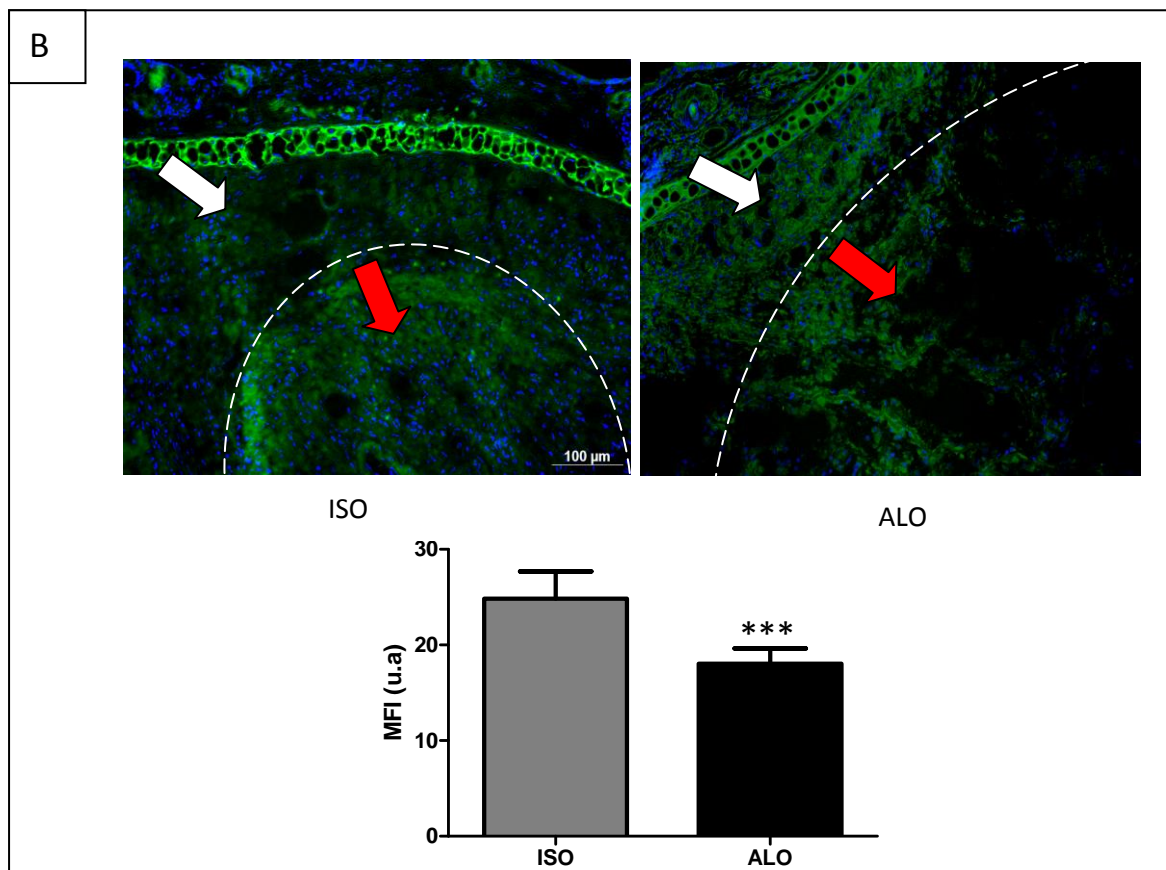


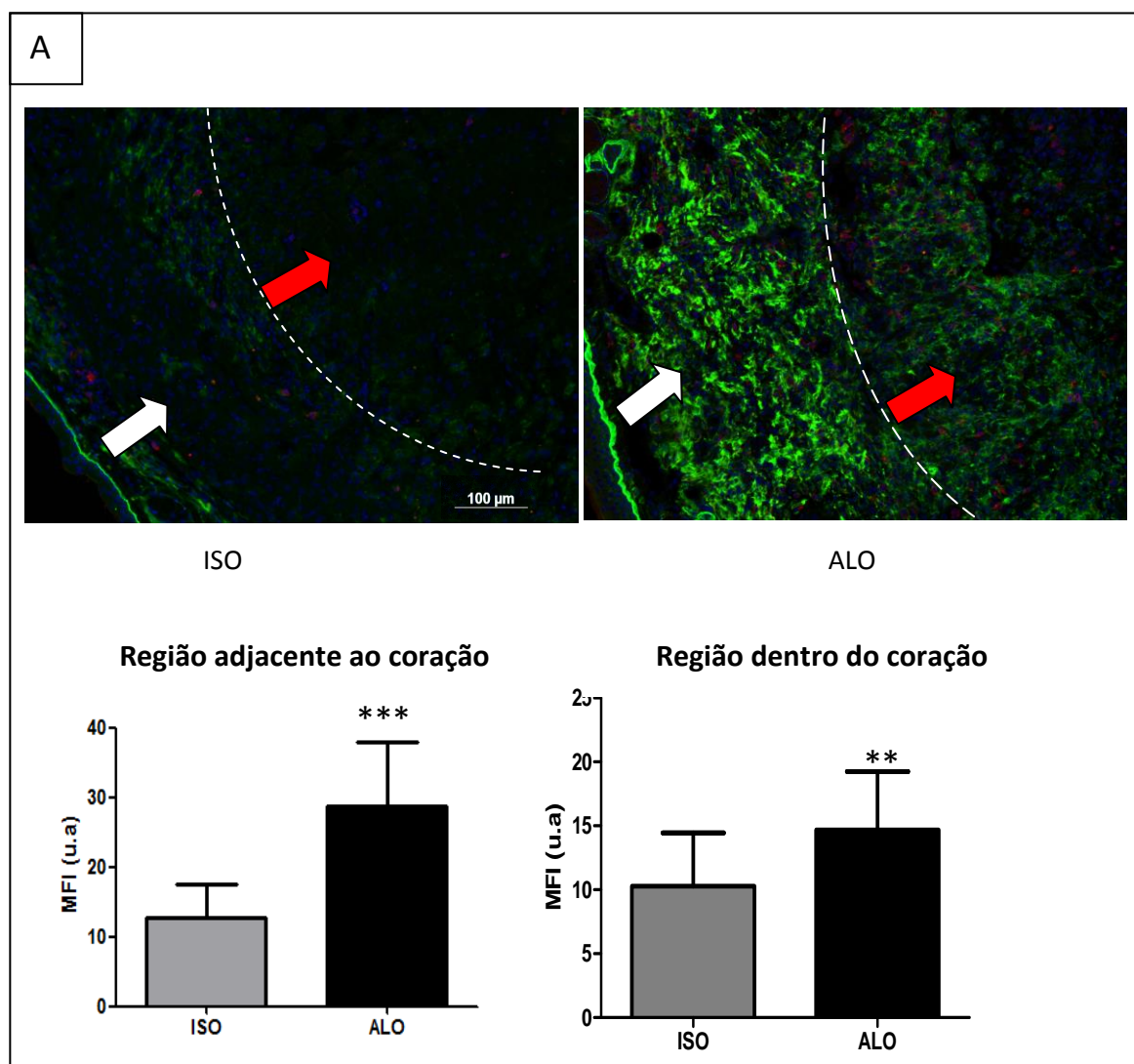
Fig.4.2.5- Deposição da LM111 e da cadeia LAMA1 nos enxertos cardíacos.

A) Imunofluorescência representativa dos enxertos isogênico e alogênico mostrando a deposição de LM111. Imagem representativa de 4 experimentos. Gráfico demonstrando a quantificação da média de intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, da LM111 nos cortes de coração isogênicos e alogênicos. Foram quantificadas 10 regiões de cada enxerto, em um total de 4 enxertos. B) Imunofluorescência representativa dos enxertos isogênico e alogênico mostrando a deposição de LAMA1. Imagem representativa de 3 experimentos. Gráfico demonstrando a quantificação da média de intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, da LM111 nos cortes de coração isogênicos e alogênicos. Foram quantificadas 15 regiões de cada enxerto, em um total de 3 enxertos. Setas brancas: região adjacente ao enxerto; Setas vermelhas; região do enxerto. Resultados expressos como a média + SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Verde: LM111 e LAMA1; Azul: DAPI. ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2.6- Deposição da isoforma LM332 e da cadeia LAMB3 nos enxertos cardíacos

A análise por qPCR mostrou que somente a cadeia LAMB3 apresentou aumento significativo nos enxertos alogênicos. Dessa forma, decidimos confirmar esse aumento em nível proteico através da técnica de imuno-histoquímica, utilizando anticorpo monoclonal específico para a cadeia LAMB3. Além disso, também analisamos a deposição da isoforma LM332, uma vez que esta isoforma é a única, claramente descrita na literatura, que possui a cadeia LAMB3 na sua constituição e é expressa em vários tecidos e órgãos, como por exemplo, pele, epiderme, pulmão e útero (57).

Corroborando os resultados de qPCR, verificamos um aumento da deposição de LM332 (Fig.4.2.6A) e da cadeia LAMB3 (Fig.4.2.6B) na região do aloenxerto e na área adjacente ao enxerto, quando comparado ao grupo isogênico.



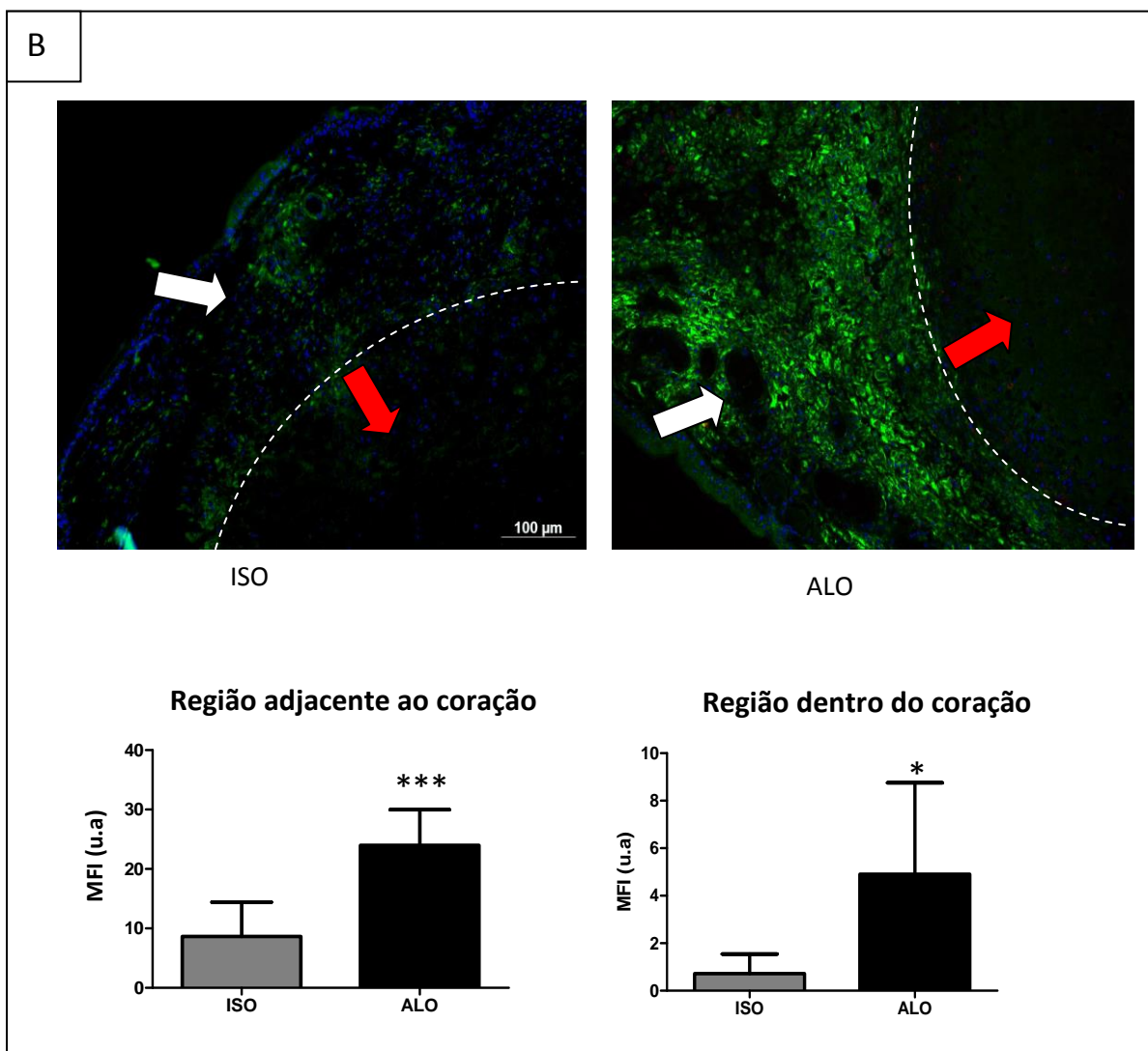


Fig.4.2.6- Deposição da LM332 e da cadeia LAMB3 nos enxertos cardíacos. A) Imunofluorescência representativa dos enxertos isogênico e alogênico mostrando a deposição de LM332. Imagem representativa de 6 experimentos. Gráfico demonstrando a quantificação da média de intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, da LM332 nas regiões adjacentes e dentro dos enxertos cardíacos. Foram quantificadas 5 regiões de cada enxerto, em um total de 6 enxertos. B) Imunofluorescência representativa dos enxertos isogênico e alogênico mostrando a deposição de LAMB3. Imagem representativa de 3 experimentos. Gráfico demonstrando a quantificação da média de intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, da LAMB3 nos cortes de coração isogênicos e alogênicos. Foram quantificadas 15 regiões de cada enxerto, em um total de 3 enxertos. Setas brancas: região adjacente ao enxerto; Setas vermelhas; região do enxerto. Resultados expressos como a média + SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Verde: LM332 /LAMB3; Azul: DAPI. ISO: isogênico, ALO: alogênico.

4.2.7- Proximidade entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com células positivas para LM332

Uma análise mais detalhada mostra, de forma interessante, uma clara proximidade entre diversas células que expressam LM332 na membrana com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, indicando uma possível interação entre essas células (Fig.4.2.7).

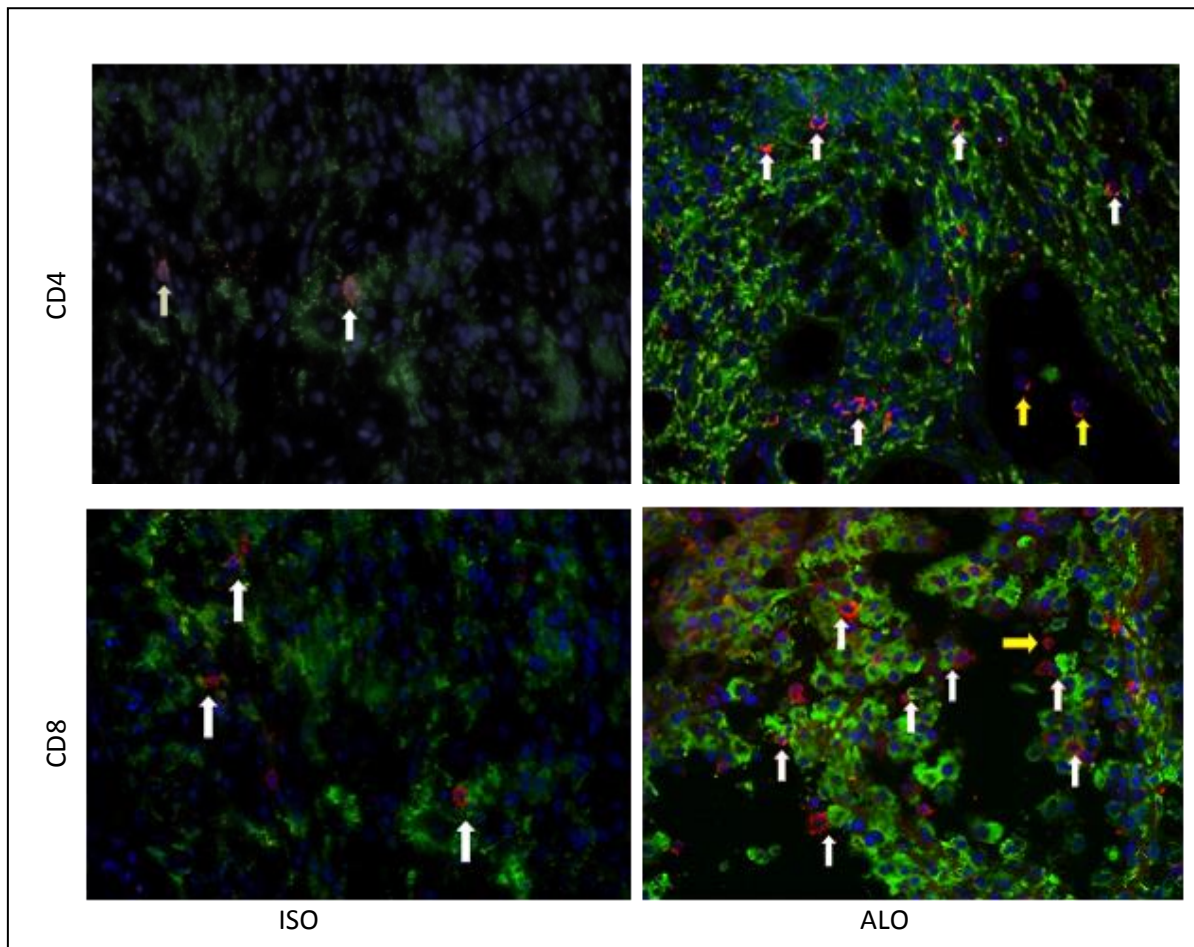


Fig.4.2.7- Proximidade entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com células positivas para LM332. Imunofluorescência representativa dos enxertos isogênico e alogênico mostrando a proximidade de células positivas para LM332 com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Imagem representativa de 6 experimentos. Verde: LM332; Vermelho: CD4/CD8; Azul: DAPI. As setas em branco indicam a possível interação entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e as células que expressam LM332, e as setas em amarelo indicam a não ocorrência dessa interação. ISO: Isogênico, ALO: Alogênico.

4.3- Capacidade migratória dos linfócitos T mediada pela LM332

Após verificarmos um aumento na expressão da cadeia LAMB3 da molécula de LM e um aumento na deposição da LM332 nos enxertos alogênicos, e tendo em vista a importância da LM para a migração de linfócitos (58), decidimos estudar a capacidade da LM332 em regular a migração dos linfócitos T.

Sabendo-se que linfócitos são ativados nos linfonodos de drenagem e, particularmente no caso de transplantes de órgãos não vascularizados, os linfonodos são necessários para que a resposta alo-específica seja montada (3, 23), decidimos usar as células desses órgãos para realizar os ensaios funcionais de migração.

Ao analisarmos a capacidade migratória dos linfócitos recolhidos dos linfonodos de drenagem, através de ensaio em câmara do tipo “Transwell”, verificamos uma redução da migração no total de células e também nas populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ frente à LM332, quando comparada à migração mediada pela LM111 (Fig.4.3A-B).

Utilizamos a isoforma LM111 como nosso controle positivo nos ensaios funcionais, pois, já é sabido que a LM111 é capaz de induzir a migração *ex vivo* de linfócitos em modelo de camundongo transgênico para o hormônio do crescimento (86). Além disso, esse papel da LM111 também já foi confirmado por trabalho anterior do nosso grupo com o mesmo modelo utilizado neste trabalho (dados não publicados).

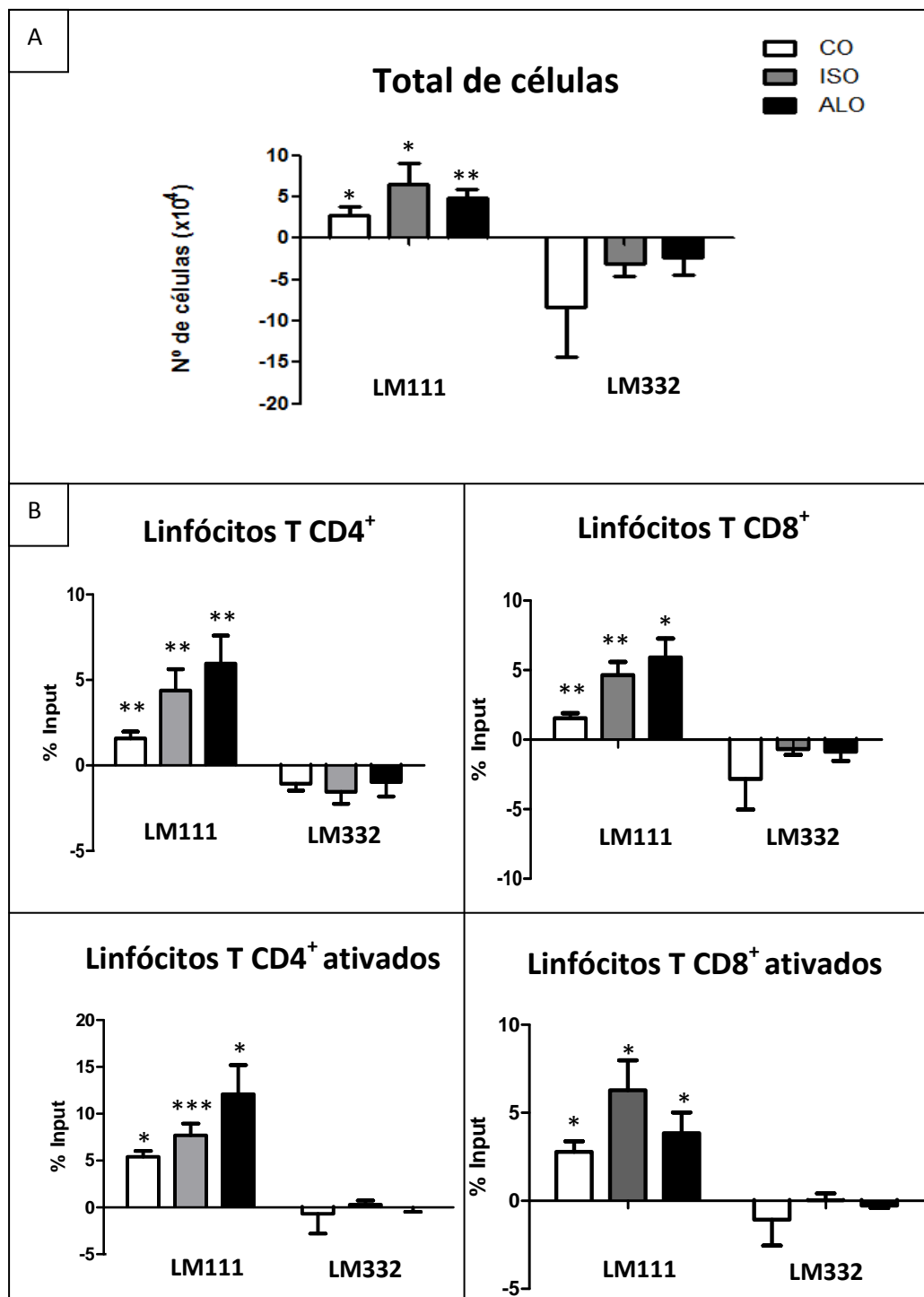


Fig.4.3- Redução na capacidade migratória dos linfócitos frente à LM332. A) Número total de células que migraram. B) % de Input (número de células que migraram $\times 100$ / número de células antes da migração) de células que migraram dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T CD4⁺ ativados e T CD8⁺ ativados. Resultados expressos como a média + SD, de um total de 6 experimentos com a LM111 e 4 experimentos com a LM332. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CO: controle; ISO: isogênico, ALO: alogênico.

5- Discussão e perspectivas

No presente trabalho, utilizamos um modelo murino de transplante cardíaco não vascularizado, no qual procuramos caracterizar os linfonodos de drenagem e o enxerto dos camundongos transplantados, visando principalmente obter um maior entendimento sobre a expressão de LM e a importância das isoformas dessa molécula para o processo de migração dos linfócitos T alorreativos. Uma vez definido as potenciais isoformas de LM e subpopulações de células envolvidas no processo de rejeição, este modelo será útil em testes com drogas, peptídeos e anticorpos capazes de modular o processo de rejeição e favorecer a sobrevivência do órgão transplantado.

Sendo assim, fizemos uma análise geral do perfil de células T nos linfonodos de drenagem de animais com transplantes alogênicos e isogênicos, comparados com os animais controles. Também caracterizamos o infiltrado inflamatório, mais especificamente os linfócitos T, dos enxertos alogênicos e isogênicos. Iniciamos uma caracterização das possíveis isoformas presentes nos enxertos e demonstramos que as cadeias LAMA1 e LAMB3 estão presentes nos enxertos alogênicos, sugerindo a presença da isoforma LM111 e confirmando a presença da isoforma 332. De forma interessante demonstramos que a LM111 estimula a migração de linfócitos T enquanto a LM332 bloqueia essa migração, ou por estimular uma forte adesão ou por possuir uma atividade de-adesiva.

Ao iniciar nossas análises dos linfonodos cervicais (linfonodos de drenagem dos enxertos cardíacos neste modelo), local onde os linfócitos T são ativados e se tornam efetores (3), verificamos um aumento expressivo da celularidade nos linfonodos cervicais e dos números absolutos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ neste órgão, esses dados reforçam o papel central dos linfonodos de drenagem em iniciar a resposta imune em nosso modelo.

Para confirmar a ativação dos linfócitos T, utilizamos as moléculas CD62L e CD44 (marcadores de ativação), e então verificamos que houve um aumento nos números absolutos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados, quando comparado aos controles. Porém, o percentual de linfócitos T ativados neste ponto da cinética é baixo (menos de 5% para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺), o que dificilmente explicaria o aumento massivo de celularidade nesses órgãos. Por outro lado, os linfonodos de drenagem dos animais alotransplantados parecem atrair mais células T virgens (87),

o que contribuiria para o aumento do órgão. Além disso, nos linfonodos existem outras células envolvidas na resposta imunológica da rejeição de transplantes que não expressam as moléculas CD4 e CD8 e provavelmente estão também sendo recrutadas, ativadas e proliferando, como linfócitos B, é importante salientar que essas células parecem ser importantes na ativação de linfócitos T CD8⁺, visto que camundongos deficientes em células B apresentam uma redução na ativação de linfócitos T CD8⁺ alorreativos em modelo de transplante de pele (88).

Quando analisamos a deposição de LM nos linfonodos de drenagem não houve diferenças qualitativas e quantitativas da deposição desta molécula entre os linfonodos de drenagem alogênicos e isogênicos. Porém, ao analisar especificamente a LM presente nos vasos dos linfonodos de drenagem, observamos um aumento no grupo alogênico. Esse aumento de LM poderia ser um dos fatores que explicariam o aumento da chegada dos linfócitos virgens nesses órgãos. Porém, será necessário identificar se esses vasos são as vênulas de endotélio alto, região de entrada dos linfócitos sanguíneos nos linfonodos (3).

Quando estudamos as subpopulações de linfócitos T no infiltrado inflamatório, verificamos um aumento significativo do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos enxertos alogênicos, assim como um enriquecimento de linfócitos T CD8⁺. Ao analisarmos os números absolutos, verificamos que as duas subpopulações apresentaram aumentos significativos de celularidade nos aloenxertos. Porém, o aumento das células CD8⁺ foi quatro vezes maior que o das células CD4⁺, quando comparados aos controles isogênicos. Esse dado corrobora dados da literatura, que demonstram o predomínio de uma resposta T citotóxica na rejeição de transplantes (8-10). O predomínio de células T citotóxicas pode ser devido à associação de fatores solúveis, como quimiocinas, e componentes da ECM, como as LMs. A análise de quimiocinas com diferentes isoformas de LM pode ser relevante para entender o predomínio dessas células no enxerto e ser um importante alvo terapêutico.

Visto que as proteínas da matriz extracelular, principalmente a LM, têm um papel importante na migração, adesão, sobrevivência e ativação de linfócitos T (23-26), decidimos analisar as isoformas de LM que estariam predominantemente expressas nos aloenxertos durante o pico de rejeição (15º dia pós-transplante). É importante ressaltar que, nos trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, apesar de ter sido demonstrado que a LM tem papel fundamental no processo de rejeição de enxertos cardíacos nesse modelo, as isoformas de LM que estariam

participando desse processo não foram identificadas. Dessa forma, essa busca foi um dos principais objetivos desse projeto.

Sendo assim, fizemos uma análise da expressão das cadeias de LM no 15º dia pós-transplante por PCR em tempo real, e verificamos que somente a cadeia LAMB3 teve sua expressão aumentada nos enxertos alogênicos quando comparado com os controles isogênicos. Também é importante salientar que a modulação das outras cadeias de LM observadas no pico da rejeição, entre os enxertos isogênicos e alogênicos, deve ser alvo de uma análise futura, pois a diminuição da expressão em diversos genes pode fornecer informações importantes para entender a resposta alogênica.

A cadeia LAMB3 é um dos constituintes da LM332 (59), por isso decidimos avaliar essa isoforma de LM, além da própria LAMB3, durante o pico de rejeição. Assim, analisamos a deposição dessas moléculas nos enxertos cardíacos e a capacidade da LM332 em induzir a migração de linfócitos retirados dos linfonodos de drenagem dos animais transplantados. Ainda, como um trabalho realizado anteriormente pelo nosso grupo demonstrou o bloqueio da rejeição com anticorpo monoclonal anti-LM111 (78), decidimos também verificar essa isoforma nos enxertos alogênicos e isogênicos. Aqui, utilizamos um anticorpo policlonal anti-LM111, para uma análise mais global, bem como um anticorpo anti-LAMA1, para certificarmos da presença da LM111, visto que as cadeias LAMB1 e LAMC1 podem ser encontradas em diversas outras isoformas.

É importante ressaltar que o mRNA de uma dada isoforma, aumentado no aloenxerto, não significa que este esteja em grande quantidade ou em maior prevalência, visto que uma maior expressão de outra isoforma pode ter ocorrido anteriormente ao 15º dia, ponto de análise em nosso estudo. Por outro lado, o aumento de uma dada cadeia/isoforma pode ter relevância biológica, e ajudar a explicar o processo de destruição do tecido transplantado que ocorre no modelo alogênico e que não ocorre no isogênico.

Ao analisarmos a deposição da isoforma LM332 e da cadeia LAMB3 nos enxertos, observamos um aumento da deposição destas moléculas na região adjacente ao aloenxerto e na região do enxerto, quando comparado ao controle (enxertos isogênicos). Uma análise mais detalhada nos permitiu identificar uma aparente interação entre as células LM332+ e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esses dados nos permitem pensar sobre um possível papel biológico exercido pela LM332 na adesão ou migração dos linfócitos presentes nos aloenxertos.

Quando analisamos a LM com o anticorpo policlonal para a isoforma LM111, verificamos um aumento da deposição desta molécula nos aloenxertos, quando comparado aos enxertos isogênicos. Já a cadeia LAMA1, teve sua deposição aumentada nos enxertos isogênicos, em relação aos aloenxertos, dados que corroboram nossos resultados de qPCR. O aumento da LM111 nos aloenxertos e o aparente resultado contraditório visto pelo aumento da deposição da LAMA1, constituinte da LM111, nos enxertos isogênicos, pode ser explicado pelo fato de o anticorpo utilizado para detectar a isoforma LM111 ser policlonal. Sendo assim, este anticorpo pode reconhecer outras isoformas que contenham em sua composição cadeias LAMA1, LAMB1 ou LAMC1, e, portanto, contribuir para a detecção de possível aumento de outras isoformas nos aloenxertos.

Principal molécula estudada neste trabalho, a LM332, denominada também de Laminina-5 pela nomenclatura antiga (89), é formada pelas cadeias alfa 3, beta 3 e gama 2 (90), codificadas pelos genes LAMA3, LAMB3 e LAMC2, respectivamente (91-93). É importante salientar que o gene LAMA3 possui duas variantes, alfa 3A e alfa 3B (93, 94), porém, não fizemos a distinção das duas variantes no presente trabalho.

A molécula LM332 é o componente principal das membranas basais da pele e outros tecidos epiteliais (90). Na pele, ela é sintetizada e secretada por queratinócitos, inicialmente em uma forma precursora, com peso molecular de cerca de 460 kDa. Após ser secretada, essa molécula pode ou não passar por um processamento (clivagem) (94). A LM332 tem um potencial altamente adesivo para as células epiteliais ou estimula a migração destas células, dependendo do seu estado de processamento, é importante na formação dos hemidesmossomos, e também possui um papel importante na regeneração da pele (95-98).

Um dos principais receptores dessa molécula é a integrina $\alpha 6\beta 4$, presente na formação dos hemidesmossomos, o que sugere um papel dessa molécula na adesão célula-membrana basal (99). Além da integrina $\alpha 6\beta 4$, já estão descritas outras moléculas que interagem com o domínio LG (domínio globular da laminina) da LM332. Dentre estas, podemos citar as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, e as proteínas sindecano-1 e sindecano-4 (Fig.5) (94).

Alguns trabalhos têm descrito uma importante atividade da LM332 na capacidade invasiva de carcinomas, estimulado a adesão e migração das células tumorais (63, 64, 100, 101). Outro estudo demonstrou que a LM332 suporta uma

forte e rápida adesão de queratinócitos, suprimindo a migração celular (102). Além disso, há dados que demonstram que a LM332 pode induzir a montagem da rede de matriz extracelular constituída pela LM511 e estimular a atividade adesiva desta isoforma (103). Pelo fato de a LM332 possuir uma função dupla, tanto estimulando a migração quanto a adesão, esta isoforma tem sido alvo de grande interesse na busca para um melhor entendimento de cada função desta molécula, principalmente nos tumores de pele.

Tendo em vista a importância da LM332 em induzir a migração de células durante o processo de cicatrização e no processo de migração e invasão das células tumorais (64, 93, 104, 105), e a falta de estudos sobre o papel desta isoforma nos processos de rejeição a enxertos, realizamos ensaios funcionais de migração com essa molécula. Utilizamos nos ensaios de migração a LM111, como controle positivo, pois já é sabido da capacidade desta isoforma em induzir a migração de linfócitos (84). Além disso, constatamos nesse trabalho a presença da LM111, confirmada pela expressão e deposição da cadeia LAMA1 nos enxertos cardíacos, indicando que essa molécula pode ter algum papel no processo de rejeição aos aloenxertos.

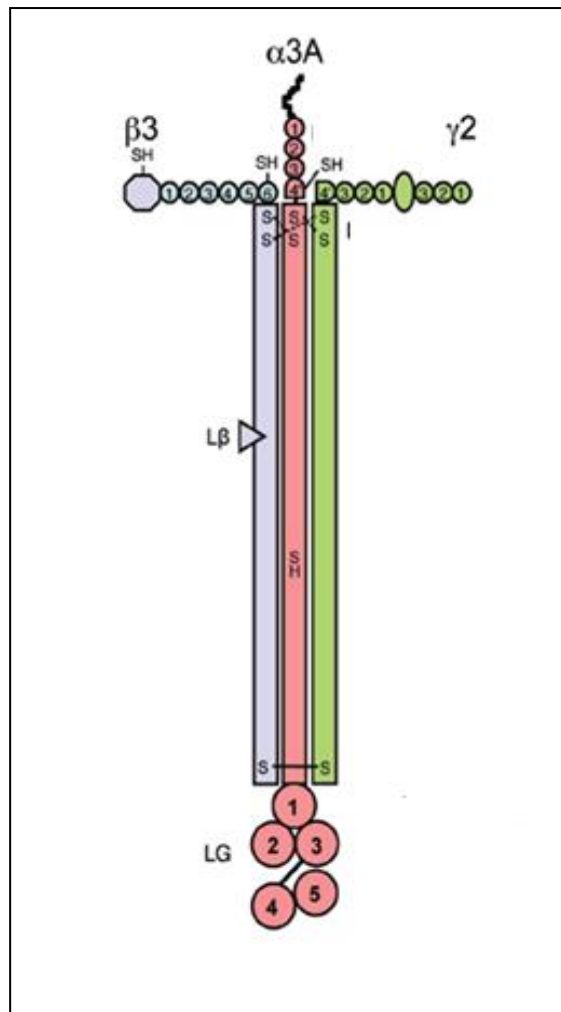


Fig.5- Estrutura da LM3A32. Constituída pelas cadeias $\alpha3\beta3\gamma2$, possui um domínio de ligação globular (LG) que se liga a integrinas e sindecano. (Adaptado de Rousselle, P., 2013).

Ao colocar os linfócitos extraídos dos linfonodos cervicais dos animais transplantados para migrar sobre a membrana de Transwell® coberta com LM332 ou LM111, verificamos que a LM332 bloqueou a migração dessas células, quando comparado à migração dos linfócitos frente ao BSA, enquanto que a LM111 estimulou a migração. Esse resultado foi observado nos linfócitos T CD4+ e CD8+, e também em células ativadas presentes nessas subpopulações, indicando a possibilidade da isoforma LM332 de promover uma adesão intratecidual forte e estável, impedindo a migração dessas células.

Dados da literatura indicam que LM332 pode também inibir a migração de queratinócitos *in vitro*, através da indução de uma adesão estável (106). Esses dados, juntamente com dados anteriormente citados, mostram que a LM332 pode exibir duas atividades opostas, como induzir uma adesão forte e estável e induzir a

motilidade celular. O processamento proteolítico da LM332 poderia explicar esses efeitos antagônicos. Já está bem descrito que a cadeia LAMA3 precursora, cujo peso molecular é de 190-200 kDa, pode ser clivada, gerando produtos de 165kDa ou 145 kDa. E a cadeia LAMC2, inicialmente com 155 kDa, pode ser processada e formar um produto de 105 kDa (99, 107). Alguns autores também já demonstraram que a cadeia LAMB3 também pode ser clivada na sua porção N-terminal (108, 109). Sendo assim, é importante destacar que alguns estudos demonstraram que a adesão e a motilidade celular foram aumentadas quando as cadeias LAMA3 e LAMC2 foram processadas (110-112).

Além do processamento das cadeias de LM, vários estudos também têm demonstrado diferentes fatores que podem estar envolvidos nas atividades opostas exibidas pela LM332. Um estudo demonstrou que a LM332 polimerizada foi capaz de inibir a migração de queratinócitos, por indução de maior adesão, quando comparada à forma purificada desta glicoproteína (104). Outro grupo verificou que ao inibir a expressão da cadeia LAMA5, constituinte da LM511, ou da cadeia LAMA3, constituinte da LM332, a direcionalidade da migração e adesão célula-célula foi prejudicada. Porém a supressão simultânea dessas duas cadeias restaurou a direcionalidade da migração e a estabilidade do contato célula-célula, sugerindo que as células reconhecem o gradiente haptotático formado pela combinação, na mesma quantidade, das isoformas de LM, e não a concentração de cada isoforma separada (113). Outros estudos revelaram que em células de carcinoma cervical, e de cabeça e pescoço, há uma expressão reduzida de microRNA-218, que tem como principal alvo a cadeia LAMB3 da isoforma LM332, e, ao restaurar nas mesmas a expressão desse microRNA, a capacidade de migração e invasão foi reduzida. Também foi observado que essas células possuíam uma expressão aumentada da cadeia LAMB3, e que esse aumento estava correlacionado com o aumento da migração e invasão celular (63, 64). Ainda, foi demonstrado uma redução da expressão das cadeias LAMB3 e LAMC2, e não da cadeia LAMA3, em células de câncer de próstata, e que, ao restaurar a expressão dessas duas cadeias, a capacidade migratória dessas células foi retomada (114). Além disso, a cadeia LAMC2 é conhecida como um marcador de tumores invasivos, pois é frequentemente expressa nesses como um monômero, não associada com as cadeias LAMA3 e LAMB3, e, ao ser secretada em grandes quantidades, estimula a migração das células tumorais (115, 116).

Tendo em vista esses diferentes fatores que podem interferir na atividade das isoformas de LM, podemos sugerir que efeitos similares possam estar operando no efeito inibitório da LM332 sobre a migração dos linfócitos T. Embora estudos futuros nesse sentido sejam necessários. É importante salientar que os ensaios *ex vivo* realizados neste trabalho levaram em consideração somente o efeito da molécula de LM332 na forma heterotrimérica, em seu estado não processado, e sozinha, o que justificaria a indução de uma forte adesão impedindo a migração dos linfócitos analisados.

Alguns trabalhos ainda demonstraram a existência de interações entre moléculas de ECM e moléculas solúveis como citocinas e quimiocinas (117), que também podem influenciar na migração de linfócitos (72, 86).

Como vimos uma expressão aumentada da cadeia LAMB3 *in vivo* nos aloenxertos, e dados da literatura reforçando que a cadeia LAMB3 aumentada em células de carcinoma foi capaz de induzir uma maior migração dessas células (56,57), pode ser que, de fato, a cadeia LAMB3 *in vivo* em nosso modelo seja secretada isoladamente e possa realmente induzir a migração de linfócitos T presentes nos aloenxertos, fazendo-se necessário um estudo futuro do efeito da cadeia LAMB3, em sua forma monomérica, na migração de linfócitos *ex vivo*. Mas é importante destacar, que também devemos levar em consideração o papel adesivo da LM332, o que também teria um efeito na rejeição do aloenxerto, pois a LM332 pode induzir uma adesão estável dos linfócitos presentes no sítio inflamatório e permitir que estes fiquem mais tempo nesse tecido sendo efetores, favorecendo assim a rejeição do aloenxerto, sendo assim ensaios de adesão com a LM332 também devem ser analisados futuramente. Além disso, pretendemos analisar a expressão das cadeias de LM em outros pontos iniciais da cinética, e dar continuidade ao estudo da isoforma LM332, utilizando para os ensaios funcionais de migração essa molécula em seu estado processado, e em conjunto com outras isoformas de LM e com outras moléculas solúveis, como quimiocinas, a fim de verificar se esses fatores presentes *in vivo*, interferem de maneira diferenciada na migração dos linfócitos T *ex vivo*, elucidando os mecanismos envolvidos no bloqueio e ativação da migração celular.

Com alguns dos mecanismos da rejeição elucidados, principalmente no que se diz respeito à migração das células alorreativas em direção ao enxerto, poderemos pensar em métodos mais específicos para bloqueio da rejeição, sem a necessidade de suprimir todo o sistema imunológico.

Esses resultados contribuem para a caracterização desse simples e econômico modelo experimental, o que é fundamental para que ele seja utilizado em testes que visem bloquear o processo de rejeição de transplantes. Além disso, os resultados da análise das isoformas de LM podem ajudar na compreensão do papel dessas moléculas no processo de rejeição de transplantes e, de forma interessante, colocam a LAMB3 e/ou a LM332 como possíveis alvos terapêuticos, principalmente pelo resultado, não esperado, de possuir uma capacidade bloqueadora da migração.

6- Referências bibliográficas

1. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172(4379):603-6.
2. Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol*. 1986;4:119-45.
3. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*. Seventh edition ed2009.
4. Banham G, Prezzi D, Harford S, Taylor CJ, Hamer R, Higgins R, et al. Elevated Pretransplantation Soluble BAFF Is Associated With an Increased Risk of Acute Antibody-Mediated Rejection. *Transplantation*. 2013.
5. Sun IO, Cho YH, Hong YA, Chung BH, Choi BS, Park GS, et al. Plasma cell-rich acute rejection with monoclonal gammopathy in a renal transplant recipient. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2013;11(2):191-4.
6. Corley RB, Kindred B. In vivo responses of alloreactive lymphocytes stimulated in vitro. Helper-cell activity of MLR-primed lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1977;6(9):923-32.
7. Dorsch S, Roser B. The clonal nature of allo-antigen-sensitive small lymphocytes in the recirculating pool of normal rats. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1974;52(1):45-66.
8. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Engl J Med*. 1975;292(24):1257-63.
9. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol*. 1977;118(6):2020-6.

10. von Willebrand E, Hayry P. Composition and in vitro cytotoxicity of cellular infiltrates in rejecting human kidney allografts. *Cell Immunol.* 1978;41(2):358-72.
11. Bishop DK, Shelby J, Eichwald EJ. Mobilization of T lymphocytes following cardiac transplantation. Evidence that CD4-positive cells are required for cytotoxic T lymphocyte activation, inflammatory endothelial development, graft infiltration, and acute allograft rejection. *Transplantation.* 1992;53(4):849-57.
12. Bishop DK, Chan S, Li W, Ensley RD, Xu S, Eichwald EJ. CD4-positive helper T lymphocytes mediate mouse cardiac allograft rejection independent of donor alloantigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Transplantation.* 1993;56(4):892-7.
13. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med.* 1996;184(5):2013-8.
14. Xiang Z, Ma LL, Manicassamy S, Ganesh BB, Williams P, Chari R, et al. CD4+ T cells are sufficient to elicit allograft rejection and major histocompatibility complex class I molecule is required to induce recurrent autoimmune diabetes after pancreas transplantation in mice. *Transplantation.* 2008;85(8):1205-11.
15. Wasowska BA. Mechanisms involved in antibody- and complement-mediated allograft rejection. *Immunol Res.* 2010;47(1-3):25-44.
16. Nozaki T, Rosenblum JM, Ishii D, Tanabe K, Fairchild RL. CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice. *Journal of immunology.* 2008;181(8):5257-63.
17. Carlquist JF, Shelby J, Hammond EH, Greenwood JH, Anderson JL. Histoincompatibility-associated differences in the phenotypes of murine cardiac allograft infiltrating T cells. *Immunology.* 1994;82(1):149-53.
18. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology.* 2011;140(1):51-64.

19. Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science*. 1987;238(4830):1073-9.
20. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. Activation signal transduction by beta1 integrin in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1559-68.
21. Savage CO, Hughes CC, McIntyre BW, Picard JK, Pober JS. Human CD4+ T cells proliferate to HLA-DR+ allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation*. 1993;56(1):128-34.
22. Krummel M, Wulfig C, Sumen C, Davis MM. Thirty-six views of T-cell recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000;355(1400):1071-6.
23. Schenk AD, Nozaki T, Rabant M, Valujskikh A, Fairchild RL. Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(8):1652-61.
24. Macedo C, Orkis EA, Popescu I, Elinoff BD, Zeevi A, Shapiro R, et al. Contribution of naive and memory T-cell populations to the human alloimmune response. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(9):2057-66.
25. Barker CF, Billingham RE. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *The Journal of experimental medicine*. 1968;128(1):197-221.
26. Gelman AE, Li W, Richardson SB, Zinselmeyer BH, Lai J, Okazaki M, et al. Cutting edge: Acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs. *Journal of immunology*. 2009;182(7):3969-73.

27. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature medicine*. 2000;6(6):686-8.
28. Zhou P, Hwang KW, Palucki D, Kim O, Newell KA, Fu YX, et al. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(3):259-66.
29. Wagnetz D, Sato M, Hirayama S, Matsuda Y, Juvet SC, Yeung JC, et al. Rejection of tracheal allograft by intrapulmonary lymphoid neogenesis in the absence of secondary lymphoid organs. *Transplantation*. 2012;93(12):1212-20.
30. Kawashima H. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(12):2343-9.
31. Halloran PF, Fairchild RL. The puzzling role of CXCR3 and its ligands in organ allograft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(8):1578-9.
32. Hancock WW, Gao W, Faia KL, Csizmadia V. Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Current opinion in immunology*. 2000;12(5):511-6.
33. Shulman Z, Shinder V, Klein E, Grabovsky V, Yeger O, Geron E, et al. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity*. 2009;30(3):384-96.
34. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.
35. Grailer JJ, Kodera M, Steeber DA. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *Journal of dermatological science*. 2009;56(3):141-7.

36. Lokmic Z, Lammermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Semin Immunol.* 2008;20(1):4-13.
37. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000;218(2):213-34.
38. Gorfou G, Virtanen I, Hukkanen M, Lehto VP, Rousselle P, Kenne E, et al. Laminin isoforms of lymph nodes and predominant role of alpha5-laminin(s) in adhesion and migration of blood lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2008;84(3):701-12.
39. Savino W, Dalmau SR, Dealmeida VC. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol.* 2000;7(2-4):279-91.
40. Coito AJ. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation.* 2011;16(1):34-40.
41. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology.* 2003;24(6):327-34.
42. Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends in immunology.* 2005;26(3):157-65.
43. Padmanabhan J, Gonzalez AL. The effects of extracellular matrix proteins on neutrophil-endothelial interaction--a roadway to multiple therapeutic opportunities. *The Yale journal of biology and medicine.* 2012;85(2):167-85.
44. Kaakkola S, Wurtman RJ. Effects of catechol-O-methyltransferase inhibitors and L-3,4-dihydroxyphenylalanine with or without carbidopa on extracellular dopamine in rat striatum. *Journal of neurochemistry.* 1993;60(1):137-44.

45. McCarthy RA, Hay ED. Collagen I, laminin, and tenascin: ultrastructure and correlation with avian neural crest formation. *The International journal of developmental biology*. 1991;35(4):437-52.
46. Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *The molecular biology of the cell*. Fourth ed.
47. Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature*. 1990;345(6272):250-3.
48. Sage EH. Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(7):781-3.
49. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J*. 1990;4(11):2868-80.
50. de Sousa M, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunology today*. 1991;12(8):262-6.
51. Epler JA, Liu R, Shimizu Y. From the ECM to the cytoskeleton and back: how integrins orchestrate T cell action. *Dev Immunol*. 2000;7(2-4):155-70.
52. Franitza S, Hershkovich R, Kam N, Lichtenstein N, Vaday GG, Alon R, et al. TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. *J Immunol*. 2000;165(5):2738-47.
53. Franz M, Grun K, Richter P, Brehm BR, Fritzenwanger M, Hekmat K, et al. Extra cellular matrix remodelling after heterotopic rat heart transplantation: gene expression profiling and involvement of ED-A+ fibronectin, alpha-smooth muscle actin and B+ tenascin-C in chronic cardiac allograft rejection. *Histochemistry and cell biology*. 2010;134(5):503-17.

54. Franz M, Neri D, Berndt A. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies. *The Journal of pathology*. 2012;226(4):557-61.
55. Vanhoutte D, van Almen GC, Van Aelst LN, Van Cleemput J, Droogne W, Jin Y, et al. Matricellular proteins and matrix metalloproteinases mark the inflammatory and fibrotic response in human cardiac allograft rejection. *European heart journal*. 2013;34(25):1930-41.
56. Riederer I, Silva-Barbosa SD, Savino W. Allogeneic heart graft rejection in mice: correlation between mononuclear cell infiltration and extracellular matrix deposition. *Transplant Proc*. 2002b;34(4):1076-8.
57. Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):259-68.
58. Savino W, Silva-Barbosa SD. Laminin/VLA-6 interactions and T cell function. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(9):1209-20.
59. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. 1979;254(19):9933-7.
60. Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006;54(6):367-74.
61. Kenne E, Soehnlein O, Genove G, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L. Immune cell recruitment to inflammatory loci is impaired in mice deficient in basement membrane protein laminin alpha4. *J Leukoc Biol*. 2010;88(3):523-8.
62. McKee KK, Yang DH, Patel R, Chen ZL, Strickland S, Takagi J, et al. Schwann cell myelination requires integration of laminin activities. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 19):4609-19.
63. Kinoshita T, Hanazawa T, Nohata N, Kikkawa N, Enokida H, Yoshino H, et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through

- targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2012;3(11):1386-400.
64. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, et al. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2013;42(5):1523-32.
65. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
66. Humphries MJ. Insights into integrin-ligand binding and activation from the first crystal structure. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S69-78.
67. Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microscopy research and technique*. 2000;51(3):280-301.
68. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269-80.
69. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2006;25(3):189-97.
70. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 19):3901-3.
71. Bosman FT. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *The Histochemical journal*. 1993;25(7):469-77.
72. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol*. 2004;75(6):951-61.

73. Coito AJ, Binder J, de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW. The expression of extracellular matrix proteins during accelerated rejection of cardiac allografts in sensitized rats. *Transplantation*. 1994;57(4):599-605.
74. Fulmer RI, Cramer AT, Liebelt RA, Liebelt AG. Transplantation of Cardiac Tissue into the Mouse Ear. *Am J Anat*. 1963;113:273-85.
75. dos Santos RR, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 1992;175(1):29-39.
76. Silva-Barbosa SD, Cotta-de-Almeida V, Riederer I, De Meis J, Dardenne M, Bonomo A, et al. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol*. 1997;159(2):997-1003.
77. Riederer I, Silva-Barbosa SD, Savino W. Allogeneic heart graft rejection in mice: correlation between mononuclear cell infiltration and extracellular matrix deposition. *Transplant Proc*. 2002;34(4):1076-8.
78. Riederer I, Silva-Barbosa SD, Rodrigues ML, Savino W. Local antilaminin antibody treatment alters the rejection pattern of murine cardiac allografts: correlation between cellular infiltration and extracellular matrix. *Transplantation*. 2002a;74(11):1515-22.
79. Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol*. 2005;12(8):1047-64.
80. Maeshima N, Poon GF, Dosanjh M, Felberg J, Lee SS, Cross JL, et al. Hyaluronan binding identifies the most proliferative activated and memory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):1108-19.

81. Mace TA, Zhong L, Kilpatrick C, Zynda E, Lee CT, Capitano M, et al. Differentiation of CD8+ T cells into effector cells is enhanced by physiological range hyperthermia. *Journal of leukocyte biology*. 2011.
82. Honjo K, Xu XY, Kapp JA, Bucy RP. Activation and migration of allo-peptide specific TCR transgenic T cells in cardiac allograft rejection. *Cell Immunol*. 2004;230(1):44-55.
83. Paiva DD, Morais JC, Pilotto J, Veloso V, Duarte F, Lenzi HL. Spectrum of morphologic changes of lymph nodes in HIV infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(3):371-9.
84. Seixas SI, Wajsenzon IJ, Savino W, Quirico-Santos T. Altered deposition of extracellular matrix components in the skeletal muscle and lymph node of the MDX dystrophic mouse. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27(9):2229-40.
85. Riederer I, Silva-Barbosa SD, Rodrigues ML, Savino W. Local antilaminin antibody treatment alters the rejection pattern of murine cardiac allografts: correlation between cellular infiltration and extracellular matrix. *Transplantation*. 2002;74(11):1515-22.
86. Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Carvalho-Pinto CE, Araujo LM, Dardenne M, Savino W. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(3):451-61.
87. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):867-78.
88. Ji H, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. Alloreactive CD8 T-cell primed/memory responses and accelerated graft rejection in B-cell-deficient sensitized mice. *Transplantation*. 2011;91(10):1075-81.

89. Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Experimental dermatology*. 2008;17(6):473-80.
90. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2005;24(5):326-32.
91. Airene T, Haakana H, Sainio K, Kallunki T, Kallunki P, Sariola H, et al. Structure of the human laminin gamma 2 chain gene (LAMC2): alternative splicing with different tissue distribution of two transcripts. *Genomics*. 1996;32(1):54-64.
92. Pulkkinen L, Gerecke DR, Christiano AM, Wagman DW, Burgeson RE, Uitto J. Cloning of the beta 3 chain gene (LAMB3) of human laminin 5, a candidate gene in junctional epidermolysis bullosa. *Genomics*. 1995;25(1):192-8.
93. Ryan MC, Tizard R, VanDevanter DR, Carter WG. Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. *J Biol Chem*. 1994;269(36):22779-87.
94. Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell adhesion & migration*. 2013;7(1):122-34.
95. Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*. 1991;65(4):599-610.
96. Marchisio PC, Cremona O, Savoia P, Pellegrini G, Ortonne JP, Verrando P, et al. The basement membrane protein BM-600/nicein codistributes with kalinin and the integrin alpha 6 beta 4 in human cultured keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1993;205(2):205-12.
97. Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol*. 1991;114(3):567-76.

98. Nissinen M, Vuolteenaho R, Boot-Handford R, Kallunki P, Tryggvason K. Primary structure of the human laminin A chain. Limited expression in human tissues. *The Biochemical journal*. 1991;276 (Pt 2):369-79.
99. Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, et al. Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol*. 1991;113(4):907-17.
100. Kwon SY, Chae SW, Wilczynski SP, Arain A, Carpenter, Philip M. Laminin 332 expression in breast carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2012;20(2):159-64.
101. Miyazaki K. Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer science*. 2006;97(2):91-8.
102. Kariya Y, Sato H, Katou N, Kariya Y, Miyazaki K. Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration. *PLoS One*. 2012;7(5):e35546.
103. Nakashima Y, Kariya Y, Miyazaki K. The beta3 chain short arm of laminin-332 (laminin-5) induces matrix assembly and cell adhesion activity of laminin-511 (laminin-10). *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(3):545-56.
104. Kariya Y, Tsubota Y, Hirosaki T, Mizushima H, Puzon-McLaughlin W, Takada Y, et al. Differential regulation of cellular adhesion and migration by recombinant laminin-5 forms with partial deletion or mutation within the G3 domain of alpha3 chain. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(3):506-20.
105. Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG, Carter WG. Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Current opinion in cell biology*. 2000;12(5):554-62.

106. O'Toole EA, Marinkovich MP, Hoeffler WK, Furthmayr H, Woodley DT. Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. *Experimental cell research*. 1997;233(2):330-9.
107. Matsui C, Wang CK, Nelson CF, Bauer EA, Hoeffler WK. The assembly of laminin-5 subunits. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23496-503.
108. Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von Bredow DC, Cress AE, Nagle RB, et al. Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer research*. 2003;63(9):2292-9.
109. Nakashima Y, Kariya Y, Yasuda C, Miyazaki K. Regulation of cell adhesion and type VII collagen binding by the beta3 chain short arm of laminin-5: effect of its proteolytic cleavage. *Journal of biochemistry*. 2005;138(5):539-52.
110. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 1997;277(5323):225-8.
111. Goldfinger LE, Stack MS, Jones JC. Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *The Journal of cell biology*. 1998;141(1):255-65.
112. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloproteinase MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *The Journal of cell biology*. 2000;148(3):615-24.
113. Greciano PG, Moyano JV, Buschmann MM, Tang J, Lu Y, Rudnicki J, et al. Laminin 511 partners with laminin 332 to mediate directional migration of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(1):121-36.
114. Drake JM, Barnes JM, Madsen JM, Domann FE, Stipp CS, Henry MD. ZEB1 coordinately regulates laminin-332 and β 4 integrin expression altering the

invasive phenotype of prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(44):33940-8.

115. Koshikawa N, Minegishi T, Nabeshima K, Seiki M. Development of a new tracking tool for the human monomeric laminin-gamma 2 chain in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2008;68(2):530-6.

116. Zboralski D, Warscheid B, Klein-Scory S, Malas MB, Becker H, Bockmann M, et al. Uncoupled responses of Smad4-deficient cancer cells to TNFalpha result in secretion of monomeric laminin-gamma2. *Molecular cancer*. 2010;9(1):65.

117. Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A, Teixido J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*. 2001;97(2):346-51.