

TATIANA TAKIISHI

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO
ENXERTO SINGÊNICO E ALOGÊNICO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TRANSPLANTE DE PELE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Imunologia).

**São Paulo
2008**

TATIANA TAKIISHI

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO
ENXERTO SINGÊNICO E ALOGÊNICO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TRANSPLANTE DE PELE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Imunologia

Orientador:
Dra. Luciana Vieira de Moraes

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Takiishi, Tatiana.

Caracterização da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico em modelo experimental de transplante de pele / Tatiana Takiishi. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Luciana Vieira de Moraes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia dos transplantes.

Versão do título para o inglês: Characterization of the inflammatory response in the syngeneic and allogeneic graft in an experimental model of skin transplantation.

Descritores: 1. Transplante de pele 2. Inflamação 3. Enxertos em animais 4. Interleucinas 5. Células 6. Imunologia de transplantes
I. de Moraes, Vieira Luciana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia.
III. Título.

ICB/SBIB106/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiana Takiishi.

Título da Dissertação: Caracterização da resposta inflamatória no enxerto
singênico e alogênico em modelo experimental de
transplante de pele .

Orientador(a): Luciana Vieira de Moraes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **118** nas fls. **37** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Luiz Vicente Rizzo, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Caracterização da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico em modelo experimental de transplante de pele**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Tatiana Takiishi e a pesquisadora Luciana de Deus Vieira de Moraes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.10.2006**.

São Paulo, 18 de outubro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA – ICB/USP

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Antonio que sempre foi o meu modelo de perseverança e luta e à minha mãe Lucia, exemplo de dedicação e paciência.

Muito Obrigada

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciana Vieira de Moraes pela sua orientação e por ter dedicado seu tempo a me ensinar assim que entrei no laboratório. Obrigada por ter me apresentado a esse mundo tão fascinante e desafiador que é a imunologia dos transplantes.

Ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, que foi meu orientador durante parte do mestrado, por ter permitido a minha entrada em seu laboratório. Agradeço pelas críticas honestas e sem rodeios que possibilitaram o amadurecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara por suas palavras de motivação e por sempre manter suas portas abertas para que esclareçam dúvidas ou simplesmente se tenha uma conversa amiga.

Ao Dr. Orlando que nos contagia com seu entusiasmo científico e com quem é possível discutir sobre os mais diversos assuntos sempre de maneira muito interessante.

Aos professores Niels, Orlando, Lourdes e Sônia que fizeram parte de minha banca de qualificação e cujas críticas construtivas foram muito importantes para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da minha banca de defesa por sua participação na etapa final deste trabalho e que sem dúvida contribuirão para que a conclusão desta tese seja a melhor possível.

Ao Rafael que sempre foi muito solícito e carinhoso, me ensinando a técnica de transplantes quando entrei no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório Julieta, Jean, Natália, Thaís e Alessandra que nestes anos se tornaram mais do que colegas, mas companheiros e amigos.

À minha família que é a base de todas as minhas forças e cuja estrutura permite com que eu me apóie nas horas difíceis. Obrigada por me estimular a sempre lutar pelos meus sonhos.

Aos meus grandes amigos Carla, Danilo, Gabriela e Renato que sempre estiveram ao meu lado para me apoiar e motivar nas horas de insegurança. Sempre me lembrarei dos momentos especiais que dividimos durante estes anos.

Ao Marcel que foi verdadeiramente um companheiro durante esta etapa e que é uma pessoa muito especial para mim.

Às amizades formadas no departamento e durante o cursão que tornaram o trabalho bem mais animado e estimulante. Vanessa, Juciane, Rebecca, Patrícia, Layra, Débora, Andrea, Daniel, Rafinha, Julieta, Natália, Carol, Josias, Cíntia, Paulo, Cristian, Janine, Welbert e Jean, desejo muito sucesso a todos.

Aos professores da pós-graduação que muitas vezes não facilitaram essa jornada, mas que sem dúvida contribuíram para o meu amadurecimento acadêmico.

À Cristina, técnica do laboratório, um exemplo de competência e sem a qual a vida no laboratório seria bem mais difícil.

À Áurea, também técnica do laboratório, cujas pequenas tarefas do dia-a-dia facilitam muito o trabalho de todos.

A todos os funcionários do departamento sem os quais nada disso seria possível.

À CAPES e ao CNPq que financiaram este projeto.

“What is a scientist after all? It is a curious man looking through a keyhole, the keyhole of nature, trying to know what’s going on.”

Jacques Yves Cousteau

RESUMO

Takiishi T. Caracterização da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico em modelo experimental de transplante de pele [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A inflamação é um evento intrínseco ao transplante, que induz o recrutamento de células inflamatórias ao sítio do enxerto, se uma amplificação dessa resposta inflamatória ocorrer, mecanismos efetores da resposta imune podem levar à destruição do tecido. No presente trabalho realizou-se a caracterização fenotípica e funcional das células inflamatórias presentes no enxerto, após o transplante alogênico ou singênico de pele em camundongos. Os resultados obtidos mostraram diferenças significativas na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias entre o transplante alogênico e singênico já nas primeiras 24 horas após o transplante. Observamos que houve produção aumentada de IL-10 no enxerto singênico em relação ao enxerto alogênico neste ponto, por isso, avaliamos a importância da IL-10 no aceite de enxertos. Para tal, camundongos IL-10 competentes (C57Bl6/IL-10^{+/+}) ou IL-10 deficientes (C57Bl6/IL-10^{-/-}) foram transplantados. Na ausência de IL-10, a rejeição de enxertos alogênicos foi acelerada e surpreendentemente 61% dos enxertos singênicos não foi aceita. Além disso, a fonte de produção de IL-10 parece influenciar o aceite dos transplantes singênicos, uma vez que os enxertos provenientes de doadores C57Bl6/IL-10^{+/+} apresentaram aceite melhor do que enxertos provenientes de doadores C57Bl6/IL-10^{-/-}. Como esses dados apontam a existência de uma regulação da resposta inflamatória no enxerto singênico, foram realizados experimentos em que a pele singênica foi transplantada, simultaneamente ou com um intervalo de 24 horas, junto à pele alogênica em um mesmo receptor. De fato, foi observado que quando o transplante simultâneo dos enxertos era realizado, houve um aumento de sobrevivência do enxerto alogênico em comparação com transplantes alogênicos transplantados sozinhos (16 dias x 8,5 dias) enquanto que com um intervalo de 24 horas entre os transplantes não houve aumento significativo da sobrevivência do enxerto alogênico. Esses dados sugerem que, dentro de um intervalo de 24 horas pós-transplante, mecanismos reguladores da resposta imune ao enxerto singênico poderiam modular a resposta inflamatória e/ou aos aloantígenos e retardar o processo de rejeição.

Palavras-chave: Transplante. Rejeição. Células Inflamatórias. IL-10.

ABSTRACT

Takiishi T. Characterization of the inflammatory response in the singeneic and allogeneic graft in an experimental model of skin transplantation. [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Inflammation is an intrinsic event in transplantation which is ignited by the damage caused during surgery. When an amplification of the inflammatory response occurs, effector mechanisms of the immune response this could lead to graft destruction due to. Studying the inflammatory context developed after transplant is of the utmost importance for a better understanding of its participation in the rejection of grafts. In the present work, functional and phenotypical characterization of inflammatory cells present in the graft was performed, after alogeneic or syngeneic skin transplantation in mice. The data shows that as early as 24 hours after transplant, significant differences in the production of pro and anti-inflammatory cytokines can be observed between the allogeneic and syngeneic grafts, being that a higher production of IL-10 was observed in the syngeneic graft when compared to the allogeneic graft at this point of 24. In order to evaluate the importance of IL-10 in the acceptance of grafts, IL-10 competent mice or IL-10 deficient mice were grafted. In the absence of IL-10, rejection of allografts was faster and surprisingly 61% of syngeneic grafts were not accepted. Furthermore, the production of IL-10 by cells that are present in the graft seems to be more important for acceptance, than the production of IL-10 by the receptor, once grafts provenient from C57Bl6/IL-10^{+/+} donors presented better acceptance than grafts provenient from C57Bl6/IL-10^{-/-} mice. This data suggests that there is a regulatory response of inflammation within the syngeneic graft, therefore, to investigate whether it would be possible to modulate the immune response against the allogeneic graft, the singeneic graft was transplanted, simultaneously or with a 24 hour interval, with the allogeneic graft into the same receptor. When transplanted simultaneously to the syngeneic graft, the allograft showed prolonged survival in comparison to allogenic grafts transplanted alone (16 x 8,5 days), this was not observed when there was a 24 hour interval between transplants. This data indicates that, within 24 hours post-transplantation, regulatory mechanisms of the immune response against the syngeneic grafts could have a modulatory effect over the inflammatory response and/or alloantigens, delaying the rejection process.

Key words: Transplantation. Rejection. Inflammatory cells. IL-10.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de pacientes à espera de transplantes nos Estados Unidos.....	15
Figura 2. Sobrevida do enxerto renal em pacientes.....	16
Figura 3. Modelo experimental utilizado.....	32
Figura 4. Modelo experimental de transplantes simultâneos.....	33
Figura 5. Fenotipagem de células emigrantes do enxerto.....	43
Figura 6. Representação de células inflamatórias após transplante singênico ou alogênico.....	44
Figura 7. Produção de citocinas e nitrito no sobrenadante de culturas de enxertos.....	48
Figura 8. Sobrevida de transplantes na ausência de IL-10.....	53
Figura 9. Aspecto macroscópico de cortes de enxertos na ausência de IL-10....	54
Figura 10. Tratamento de enxertos com IL-10 recombinante.....	55
Figura 11. Controle de camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-}.....	56
Figura 12. Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplante alogênico em camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-}.....	59
Figura 13. Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplante singênico em camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-}.....	62
Figura 14. Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplante singênico em combinações de doador ou receptor C57Bl6/IL-10^{-/-}.....	65
Figura 15. Sobrevida do enxerto alogênico e singênico quando transplantados em um mesmo receptor.....	68
Figura 16. Aspecto macroscópico do enxerto alogênico e singênico quando transplantados em um mesmo receptor.....	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais de experimentação.....	31
3.2 Abordagem experimental.....	31
3.3 Transplante de Pele.....	33
3.4 Histologia.....	33
3.5 Obtenções de células emigrantes do enxerto.....	34
3.6 Tratamento com IL-10 recombinante.....	34
3.7 Extração de DNA para genotipagem.....	35
3.8 Genotipagem.....	35
3.9 Análise de citocinas.....	36
3.10 Dosagem de nitrito.....	36
3.11 Caracterização celular.....	37
3.11.1 Citocentrifugação.....	37
3.11.2 Citometria de Fluxo.....	37
3.12 Análise Estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Caracterização Fenotípica e funcional das células emigrantes do enxerto alogênico e singênico.....	40
4.1.1 Caracterização Fenotípica.....	40
4.1.2 Caracterização Funcional.....	45
4.2 Avaliação da influência de Il-10 na progressão do transplante singênico e alogênico.....	49
4.2.1 Sobrevida de enxertos alogênicos e singênicos.....	49
4.2.2 Sobrevida do enxertos singênico em combinações doador-receptor IL-10^{+/+} →IL-10^{-/-} ou IL-10^{-/-} →IL-10^{+/+}.....	51

4.2.3 Caracterização de células inflamatórias.....	57
4.2.3.1 Caracterização de células inflamatórias no transplante alogênico.....	57
4.2.3.2 Caracterização de células inflamatórias no transplante singênico em combinações doador-receptor IL-10 ^{-/-} → IL-10 ^{-/-} ou IL-10 ^{+/+} → IL-10 ^{+/+}	60
4.2.3.2 Caracterização de células inflamatórias no transplante singênico em combinações doador-receptor IL-10 ^{-/-} → WT ou WT → IL-10 ^{+/+}	63
4.3 Avaliação da sobrevida do enxerto alogênico e singênico transplantados em um mesmo receptor.....	66
5 DISCUSSÃO.....	71
6 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dados Mundiais e Nacionais de transplantes

Muitas vezes o transplante é a única solução para pacientes cujos órgãos sólidos estão em estágio final de funcionamento. O número de pacientes transplantados tem aumentado a cada ano, e esse é um procedimento que tem se tornado cada vez mais comum para o tratamento de algumas doenças. Apesar do aumento no número desses procedimentos, ele ainda é insuficiente conforme pode ser visto na figura 1 e muitos pacientes morrem durante a espera.

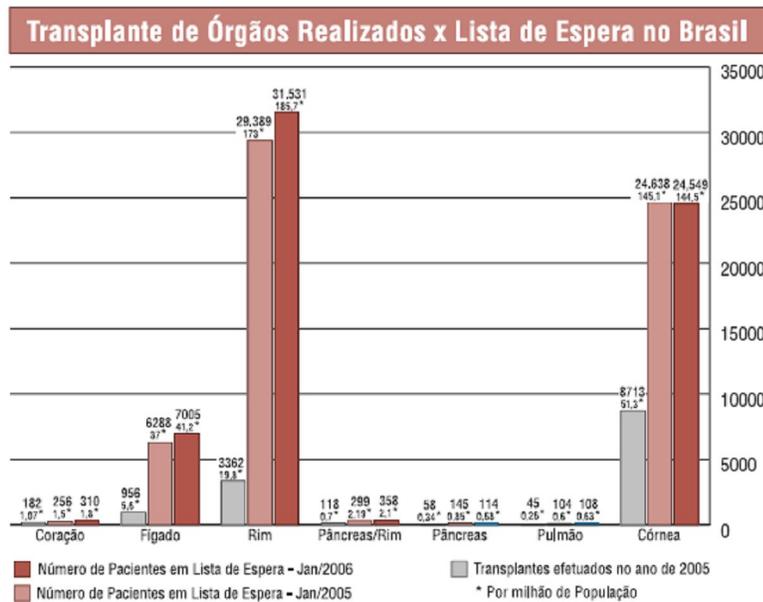


Figura 1- Número de pacientes à espera de transplante no Brasil no ano de 2005.

FONTE: Registro Brasileiro de Transplantes, 2003.

Segundo dados da World Health Organization (WHO, 2003), cerca de 70000 transplantes de órgãos sólidos são realizados anualmente, dos quais 50000 são transplantes de rim. No Brasil, segundo os dados da Associação Médica Brasileira (AMB, 2003) o número de transplantes de órgãos sólidos realizados em 1997 foi de 2.127 e cresceu para 3.916 em 2001, enquanto que só no primeiro semestre de 2006 esse número foi de 4825 transplantes segundo os dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT, 2006). O transplante de tecidos também é uma prática crescente e em 1999 nos Estados Unidos, cerca de 750.000 pessoas receberam tecido humano, o dobro de 1990. Estima-se que centenas de milhares de transplantes sejam

realizados anualmente, dentre os quais o transplante de medula e pele representam um número significativo (WHO, 2003).

Apesar de o transplante ter se tornado um procedimento médico relativamente comum que foi possibilitado graças ao desenvolvimento de drogas e terapias imunossupressoras, a rejeição crônica continua sendo um problema. Conforme pode ser visto na figura 2, a maior parte dos transplantados perde a funcionalidade e são rejeitados com a progressão dos anos, tornando necessária uma nova intervenção cirúrgica.

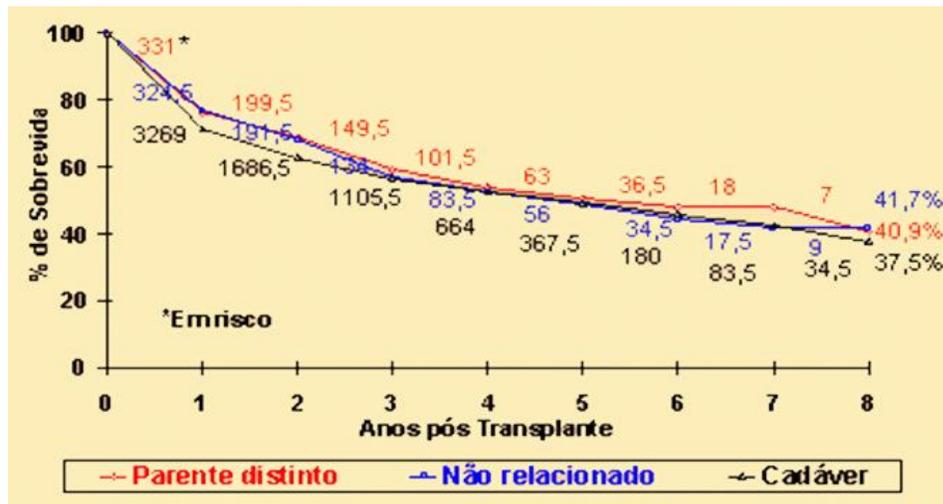


Figura 2- Sobrevivência do enxerto renal em receptores: Parente distinto (n=365), não-relacionado (n=361) e doador cadáver (n=3728), 1987-1995.

FONTE: Cia-EPM/UNIFESP.

1.2 História dos transplantes

Devido ao seu grande potencial terapêutico a imunologia dos transplantes vem sendo estudada há muito tempo. Os estudos na área de transplantes são muito antigos. Existe o relato de que em 800 a.C. um cirurgião indiano chamado Susrata realizava transplantes a partir de pedaços de pele na tentativa de reparar narizes que haviam sido cortados como forma de castigo (Deschamps et al., 2005). Durante séculos cirurgiões realizaram diversos tipos de tentativas de transplante, sem obter sucesso (Kulinna-Cosentini e Bankier, 2007). Em 1597 um famoso cirurgião chamado Gaspare Tagliacozzi disse algo que indicava a razão para esse fracasso: “(...) o caráter singular do indivíduo nos dissuadiu completamente de tentar esse trabalho (transplante de tecidos) em outra pessoa (...)”. Esse comentário realizado séculos

antes da Primeira Guerra Mundial foi extremamente avançado para a época, pois somente na década de 20 os geneticistas mendelianos começaram a esclarecer as bases de da histocompatibilidade genética (Silverstein, 1989; Youssef et al., 2004)

É interessante observar que os primeiros trabalhos que possibilitaram desvendar os fatores relacionados à rejeição não foram realizados por cientistas da área de transplantes. A descoberta do complexo MHC, na década de 30, foi possibilitada graças aos estudos realizados por pesquisadores na área de tumores. Ao inocular células tumorais em camundongos, esses cientistas verificavam que havia rejeição dos tumores, dentre esses cientistas figuraram George Snell e Peter Gorer. Na Inglaterra, Peter Gorer descobriu um anticorpo de hemaglutinina que estava associado com a rejeição dos tumores, o antígeno responsável por desencadear essa resposta humoral recebeu o nome de Gorer antigen II. Nos Estados Unidos, George Snell criou os camundongos congênicos, que são camundongos que diferem entre si em apenas um locus; ele descobriu que esse locus estava associado à rejeição dos tumores e por isso nomeou esse locus “H” (de histocompatibilidade). Posteriormente, foi identificado que o gene responsável pela produção do antígeno descoberto por Gorer estava localizado no locus de Snell, e todo o complexo de histocompatibilidade de genes murinos ficou conhecido como H-2 (Silverstein, 1989).

Em 1943, Peter Medawar e Thomas Gibson publicaram seu primeiro estudo sobre o problema da rejeição de peles alogênicas, iniciando a era moderna dos estudos sobre transplante. Quinze anos depois Medawar, Brent e Billingham publicaram o primeiro trabalho em que foi mostrada a obtenção da tolerância a peles transplantadas na ausência de imunossupressores, através da inoculação de alo-antígenos no receptor em seu período de desenvolvimento embrionário.

1.3 Rejeição

Desde então mais de 60 anos se passaram e apesar do desenvolvimento de drogas e terapias imunossupressoras mais eficientes ainda não se conseguiu atingir um nível satisfatório de aceite e tolerância aos transplantes. A rejeição crônica, principalmente, é um problema recorrente dos transplantes. Além disso, existem efeitos colaterais graves causados pela terapia de imunossupressão a longo prazo (Kingsley et al., 2007).

No caso do transplante de pele, especificamente, por se tratar de um órgão muito imunogênico, o aceite de peles alogênicas é extremamente difícil e apesar dos diversos estudos na área, os mecanismos que tornam a pele mais susceptível à rejeição ainda não são totalmente claros (Horner et al., 2008).

Em 2001 Jones et al realizou um trabalho comparando a susceptibilidade de enxertos alogênicos de coração, peles e ilhotas pancreáticas à rejeição mediada por células T. Seu trabalho mostra que 1×10^3 linfócitos T antígeno-específicos eram capazes de mediar a rejeição de enxertos de pele e ilhotas enquanto para rejeição do coração eram necessários 6×10^6 linfócitos T. O seu trabalho, no entanto, não foi capaz de elucidar a razão pela qual esse número tão pequeno de linfócitos T foi capaz de mediar rejeição aos enxertos de pele e ilhotas, quando, ao contrário do esperado, a detecção dessas células nestes órgãos foi mais tardia em comparação com os enxertos cardíacos (3 dias x 7 dias) e não foi detectada proliferação de células T aloreativas no baço doas animais após transplantes de pele ou ilhotas enquanto após o transplante cardíaco a proliferação destas células foi alta (Jones et al., 2001).

Alguns trabalhos sugerem que a grande quantidade de células de langerhans na pele contribuiria para sua maior susceptibilidade à rejeição. Após o transplante, essas células se ativariam e migrariam para linfonodos drenantes onde promoveriam a estimulação e ativação de linfócitos T (Larsen et al., 1990; Richters et al., 1999). Outro fator que pode contribuir para sua imunogenicidade é a presença de queratinócitos, estas células podem secretar uma série de citocinas inflamatórias e expressar moléculas de adesão, além de uma alta concentração de glicoproteínas da matriz extracelular que podem facilmente atrair e fixar células T ativadas (Barclay e Mason, 1982; Berg et al., 1991; Kupiec-Weglinski et al., 1997).

Apesar de todas as questões envolvendo a rejeição de peles, em novembro de 2007 foi realizado o primeiro transplante parcial de face que 18 meses após a cirurgia ainda mantinha-se viável. Este, no entanto já sofreu dois episódios de rejeição aguda que foram contornados com imunossuppressores, portanto é importante considerar de que este tipo de transplante se trata de um caso único e não está livre de complicações; o enxerto apresenta eritema e hiperplasia e, além disso, o regime inicial de imunossupressão provocou diminuição das funções renais da paciente (Dubernard et al., 2007).

Fenômenos como hiperplasia e contração do enxerto causada por fibrose são complicações comuns após transplantes de pele e podem levar a perda parcial ou

total da funcionalidade do enxerto (Leibovitch et al., 2005). Em 1943, Medawar já relatara o fenômeno de contração e formação de tecido granuloso em parte de enxertos de pele autólogos transplantados em uma paciente (Gibson e Medawar, 1943).

1.4 Neutrófilos

O processo de rejeição envolve mecanismos complexos e populações celulares diversificadas. O início desse processo ocorre através de sinais de perigo induzidos por danos teciduais durante o processo cirúrgico. Esse dano induz a produção de proteínas induzidas por estresse (stress-inducible proteins) (Andrews e Smyth, 2008) e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF- α , que por sua vez ativam as células do endotélio (Ando et al., 2007). As células do endotélio quando ativadas produzem quimiocinas como a IL-8, Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CXCL-1) e Macrophage inflammatory protein (MIP-2) que levam ao influxo de neutrófilos para o enxerto (el-Sawy et al., 2002).

Em geral, a presença de neutrófilos é considerada deletéria para os enxertos, pois estas células produzem e liberam uma série de substâncias que podem causar dano tecidual, dentre elas: espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas. Além disso, produzem quimiocinas que atraem e ativam APCs e elas próprias já foram descritas como capazes de processar antígenos e expressar moléculas de MHC bem como moléculas coestimulatórias, comportando-se como APCs (Potter e Harding, 2001; Reali et al., 1996). Há trabalhos que indicam que a depleção de neutrófilos resulta em aumento da sobrevida de enxertos alogênicos (El-Sawy et al., 2004; Hirayama et al., 2006).

No caso de enxertos de pele, no entanto, os neutrófilos podem ter um importante papel na neovascularização desses tecidos. Trabalhos recentes têm correlacionado a entrada de neutrófilos ao processo de angiogênese, sendo relatado que a depleção de neutrófilos resulta na redução do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e conseqüentemente numa diminuição significativa do processo de ativação de angiogênese (Nozawa et al., 2006). Dados semelhantes também foram observados por (Ohki et al., 2005) em tecidos submetidos ao processo de isquemia-reperfusão, nestes tecidos há promoção de angiogênese quando células tronco ou células

progenitoras endoteliais ativadas por G-CSF são estimuladas por VEGF secretado por neutrófilos.

Além do papel dos neutrófilos na angiogênese, foi relatado que neutrófilos também podem participar do início da resposta de reparação tecidual. Em um modelo de dano muscular em que se estudou regeneração de fibras musculares, bloqueou-se a entrada de neutrófilos no local danificado. Foi observado que embora tenha ocorrido diminuição de dano tecidual, também ocorreu um retardo no reparo tecidual (Toumi et al., 2006). Portanto, os neutrófilos possuem funções diversificadas e não se pode concluir que a presença de neutrófilos no enxerto seja sempre prejudicial.

1.5 Células Th17

Recentemente foi descrita uma população de células que foi relacionada ao recrutamento de neutrófilos e a uma série de doenças inflamatórias. Essas células foram chamadas de Th17, por serem um subtipo de linfócitos T CD4 que secretam IL-17 (Harrington et al., 2006).

Apesar dos estudos sobre essa população celular serem recentes, os fatores que levam a geração e manutenção dessas células parece estar bem estabelecido. A IL-6 juntamente com o $TGF\beta$ são importantes para a diferenciação de células Th0 para Th17 (Veldhoen et al., 2006), enquanto IL-2 e $IFN\gamma$ suprimem a geração dessas células, induzindo respectivamente a expressão de Forkhead box protein 3 (FOXP3) e signal transducer and activator of transcription (STAT 4) (Laurence et al., 2007; Nakae et al., 2007). Outra citocina importante para as células Th17 é a IL-23 que além de estar envolvida na manutenção e proliferação dessas células, é um forte indutor de IL-22 e IL-17 nas células Th17 (Bettelli et al., 2006; Kebir et al., 2007; Liang et al., 2007).

O fato de que parece existir uma regulação entre a geração de células Treg e células Th17 dependendo do balanço de citocinas no linfonodo, indicam que se o contexto inflamatório gerado no transplante tender para a geração de células Th17, provavelmente haveria grande recrutamento de neutrófilos nos enxertos e isso aumentaria as chances de rejeição. Como já é bem estabelecido que existe participação de neutrófilos na rejeição é muito provável que células Th17 tenham participação nesse processo.

Em concordância com essa teoria, há evidências de que o aumento de IL-17 está relacionado à rejeição de enxertos (Antonysamy et al., 1999; Loong et al., 2002),

no entanto o papel das células Th17 em transplantes ainda não é muito claro e serão necessários um maior número de estudos para esclarecer esta questão.

1.6 Macrófagos

Além dos neutrófilos, os macrófagos são um tipo celular que exercem funções diversificadas, dependendo do meio em que se encontram podem secretar substâncias pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Portanto dependendo da função que exercem, podem contribuir para o processo de rejeição ou auxiliar no controle da resposta inflamatória contribuindo para o aceite dos enxertos.

Os macrófagos compõem uma população celular que está continuamente presente no tecido ou órgão transplantado (Hancock et al., 1983). Em transplantes renais a dinâmica de entrada destas células é bem estabelecida. Logo após o transplante há grande influxo destas células devido ao processo inflamatório gerado pela isquemia-reperfusão. Após 24 horas já é possível observar essa população no enxerto e no transplante alogênico ela aumenta e acumula, sendo que em rins que sofreram rejeição aguda, elas compõem entre 38 a 60% do infiltrado celular (Hancock et al., 1983). Já em transplantes alogênicos não-rejeitados, conforme ocorre resolução da resposta inflamatória há diminuição do número de macrófagos, mas ainda é observada persistência dessas células no enxerto (Grimm et al., 1999).

O duplo papel dos macrófagos durante a inflamação é bastante discutido na literatura. Macrófagos podem induzir inflamação através da liberação de espécies reativas de oxigênio, enzimas hidrolíticas, citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas, além de óxido nítrico (Laskin e Pendino, 1995; Sharma et al., 2007; Zhang et al., 2007). No entanto, essas células também promovem resolução da inflamação, promovendo o reparo e a cicatrização tecidual através da secreção de collagenase, promoção da angiogênese e a fagocitose de células mortas (Fadok e Chimini, 2001; Poverini et al., 1977; Werb e Gordon, 1975). Quanto ao processo de fagocitose de células mortas, há trabalhos mostrando que a fagocitose de células apoptóticas e de células necróticas ocorre por mecanismos diferentes (de Oliveira et al., 2006; Krysko et al., 2006), e embora os dados ainda não sejam claros, existem indícios que a fagocitose de células apoptóticas induz a produção de citocinas anti-inflamatórias nos macrófagos, enquanto a ingestão de células necróticas leva a produção de citocinas pró-inflamatórias (Fadok et al., 1998; Krysko et al., 2006).

Durante o processo inflamatório que segue o transplante, os macrófagos exercem diferentes funções, atuando tanto na indução do processo inflamatório quanto em sua resolução. Esses papéis foram mostrados em um modelo de isquemia-reperfusão renal, no qual se observou que logo após a isquemia-reperfusão havia produção local de Macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) e Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), grande infiltração de macrófagos e dano tecidual baixa. Enquanto que em tempos mais tardios após a isquemia havia alta produção local de IL-10 e a regeneração era dependente de macrófagos (Vinuesa et al., 2008).

1.7 Óxido Nítrico

Dentre os produtos liberados por macrófagos, o óxido nítrico é um produto de grande interesse, pois ele atua na modulação de diversas respostas do sistema imune. Os primeiros trabalhos definiram esse composto como sendo um produto liberado por macrófagos que possuía função tumoricida e antimicrobiana (Nathan, 1992). Atualmente essa definição se expandiu razoavelmente, especialmente devido ao fato de se ter descoberto que além dos macrófagos, existem diversos tipos celulares que produzem óxido nítrico bem como respondem ao seu estímulo (Bogdan, 2001). Essa descoberta ampliou muito o espectro de atuação do óxido nítrico no sistema imune.

No caso dos transplantes altas concentrações de óxido nítrico podem auxiliar no processo de rejeição dos enxertos por causar aumento da fibrose e necrose de tecidos (Kolb e Kolb-Bachofen, 1998; Pfeilschifter et al., 2001). Além disso, existem diversos trabalhos associando a produção aumentada de óxido nítrico durante a rejeição de enxertos alogênicos (Holan et al., 2002; Holan et al., 2005; Vos et al., 2000; Winlaw et al., 1995; Worrall et al., 1997).

Conforme mencionado anteriormente, apesar de promoverem a inflamação, os macrófagos também possuem uma importante função para resolução deste processo (Leibovich e Ross, 1975), promovendo o reparo e a cicatrização tecidual através da secreção de colagenase (Werb e Gordon, 1975), promoção da angiogênese (Polverini et al., 1977) e a fagocitose de células apoptóticas (Fadok e Chimini, 2001). Os macrófagos também produzem um composto que é de suma importância para a regulação da resposta inflamatória é a IL-10 (de Waal Malefyt et al., 1991).

1.8 IL-10

A IL-10 foi inicialmente descrita como “cytokine synthesis inhibitory factor” (CSFI) sendo reconhecida por sua capacidade de inibir a ativação e produção de citocinas por células Th2 (Fiorentino et al., 1989). Sua principal função parece, de fato, ser limitar e terminar respostas inflamatórias, papel que pode ser demonstrado pelo desenvolvimento espontâneo ou maior susceptibilidade a doenças inflamatórias em camundongos IL-10 deficientes (Johansson et al., 2001; Kuhn et al., 1993). A IL-10 também regula o crescimento e/ou diferenciação de um amplo espectro de células, como células B, células Natural killer, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (Moore et al., 2001).

Como dito anteriormente, os macrófagos são importantes produtores de IL-10, mas existem diversos tipos celulares que também produzem esta citocina. Na pele, mais especificamente, existem importantes fontes de produção de IL-10, dentre elas as próprias células epiteliais, células endoteliais, células dendríticas, células de Langerhans e também queratinócitos, sendo que este último grupo celular compõe uma parcela significativa das células presentes na epiderme e também podem ser uma importante fonte de IL-10 (Enk et al., 1993).

Devido ao papel da IL-10 na supressão de respostas celulares, muitas tentativas têm sido realizadas quanto ao emprego dessa citocina na terapia de transplantes, tentando-se induzir tolerância em enxertos alogênicos (Moore et al., 2001).

Os resultados obtidos nestes trabalhos, no entanto, são bastante contraditórios. Existem casos em que se observa aumento da sobrevida e casos em que não há alteração ou há diminuição da sobrevida do enxerto. Alguns trabalhos mostraram que enxertos de fígados alogênicos, tratados com IL-10 recombinante ou transfectados com o gene de IL-10, apresentaram aumento de sobrevida (Fabrega et al., 1996; Shinozaki et al., 2000; Shinozaki et al., 1999; Zou et al., 1998). Já no transplante cardíaco são relatados casos em que o tratamento resulta em aumento de sobrevida (Fischbein et al., 2003; Oshima et al., 2007) ou em rejeição acelerada com agravantes de doença arterial (Furukawa et al., 1999; Qian et al., 1996) e no caso de ilhotas pancreáticas o tratamento com IL-10 não aumenta a sobrevida dos enxertos, sendo que em alguns casos parece acelerar a rejeição (Kuttler et al., 2007; Zheng et al., 1995)

O motivo pelo qual esses efeitos diversos são observados ainda não é muito bem compreendido, mas parece ter relação com a quantidade de IL-10 produzida localmente (Moore et al., 2001) e o tipo de tecido transplantado (Jones et al., 2001); portanto não é possível admitir que a simples administração de IL-10 poderá suprimir a resposta imune contra os enxertos alogênicos.

1.9 Linfócitos T CD4 e T CD8

Além da contribuição de neutrófilos e macrófagos para o processo da rejeição, existe também uma grande participação de linfócitos neste processo.

Apesar dos inúmeros trabalhos investigando o papel das células T CD3⁺CD4⁺ e células T CD3⁺CD8⁺ no processo de rejeição dos transplantes, os dados à respeito da contribuição relativa de cada população celular neste processo ainda são controversos.

Alguns trabalhos afirmam que a presença de células T CD3⁺CD4⁺ seria fundamental para a rejeição de enxertos alogênicos (Krieger et al., 1996; Zhao et al., 2000), enquanto outros indicam que células T CD3⁺CD8⁺ são capazes de mediar rejeição sem a presença de células T CD3⁺CD4⁺ (Bishop et al., 2001).

Há trabalhos indicando que células T CD4⁺ teriam participação maior na rejeição de enxertos quando há disparidade entre o receptor e o doador no MHC classe II, enquanto que células T CD8⁺ participariam da rejeição mediada por disparidades no complexo MHC classe I, esses trabalhos sugeriam que a presença de ambos tipos celulares seria fundamental para ocorresse a rejeição (Christianson et al., 1993; Rosenberg et al., 1987). Outros trabalhos descreviam que células T CD8⁺ não seriam capazes de mediar a rejeição, sem a presença de células T CD4⁺ (Bradley et al., 1992; Rees et al., 1990).

No entanto, Rosemberg et al (1987, 1988, 1992) mostraram que a presença de apenas um dos subtipos celulares era capaz de induzir rejeição aos transplantes alogênicos e mostraram que células T CD8⁺ não só podem mediar a rejeição, mas também podem exibir dupla função atuando como células citotóxicas ou auxiliares.

Em 2004, Youssef e cols (Youssef et al., 2004) mostraram que a participação de células T CD4⁺ ou CD8⁺ depende do tecido transplantado e do grau de disparidade antigênica. A pele é rejeitada tanto por células T CD4⁺ ou CD8⁺ em qualquer grau de incompatibilidade genética, porém na ausência de células T CD4⁺ a pele alogênica

apresentava aumento de sobrevida. Já o enxerto alogênico cardíaco apresentava aceitação, quando havia graus menores de incompatibilidade genética, na ausência de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ (Rosenberg et al., 1988; Rosenberg e Singer, 1992).

1.10 IFN γ

Ao se discutir a participação de células T CD8⁺ na rejeição é imprescindível que se discuta também sobre o papel do IFN γ nesse processo. Esta citocina além de ser um potente ativador de células T CD8⁺, aumenta a apresentação de antígenos por estar envolvida em cascatas proteolíticas que asseguram o processamento correto de peptídeos necessários para a apresentação via MHC classe I (Strehl et al., 2005). Além disso, a produção de IFN γ por células T CD8⁺ infiltrantes no enxerto podem estimular os neutrófilos a produzirem quimiocinas, como a CXCL9, CXCL10 e CXCL11 que, por sua vez recrutam linfócitos T ativados (Morita et al., 2001).

Outro mecanismo de rejeição mediado por IFN γ ocorre através da produção dessa citocina por células T CD8⁺ de memória. Há evidências de que a presença de células T CD8⁺ CD62L^{low} a produção de IFN γ em pacientes pré-transplantados, levam à um maior risco de rejeição pós-transplante (Heeger et al., 1999). Em camundongos, foi demonstrado o recrutamento precoce de linfócitos T CD8⁺CD62L^{low} pré-existentes induz o recrutamento de células polimorfonucleares e aumenta necrose do enxerto (El-Sawy et al., 2004). Há ainda, evidências apontando que a presença de células T de memória pode ser responsável pela falha em induzir tolerância ao enxerto alogênico, tanto em animais quanto em humanos, pois essas células são extremamente resistentes à apoptose (Brook et al., 2006).

1.11 Mecanismos diversos envolvidos na rejeição

Indubitavelmente, a incompatibilidade entre o enxerto e o receptor, determinada pelos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é fator de enorme importância para a indução da rejeição, muito embora antígenos não ligados ao MHC também possam induzir resposta alogênica (Hildemann et al., 1970).

Durante um longo período atribuiu-se ao sistema imune adaptativo a responsabilidade de gerar respostas específicas que levariam a rejeição ou tolerância do órgão transplantado e que o compartimento inato seria apenas a primeira linha de

defesa contra microorganismos. Entretanto, esse tipo de visão vem sendo questionado e atualmente há trabalhos que demonstram a importância do sistema imune inato e também de danos não-específicos que podem levar a rejeição.

O descobrimento dos Toll-like-receptors (TLRs) foi um importante evento que permitiu que indicou a existência de uma interação entre o sistema imune inato e adaptativo (Medzhitov e Janeway, 2002). Tendo em vista que a ativação do sistema imune adaptativo depende não somente da apresentação de antígenos dependente do MHC, mas também da indução de moléculas acessórias em APCs, Snare et al (2001) criou a hipótese de que TLRs expressadas em APCs poderia regular os sinais acessórios (co-estimuladores e citocinas) e conseqüentemente controlar a ativação de respostas adaptativas antígeno-específicas. Seus estudos mostraram que camundongos nocaute de MyD88, uma importante proteína adaptora para a sinalização via TLRs (Muzio et al., 2000), apresentavam deficiências em respostas Th1 antígeno-específicas (Schnare et al., 2001).

Em transplantes, em um modelo de isquemia-reperfusão renal foi mostrado expressão aumentada de RNAm de TLR 2 e TLR4 (Wolfs et al., 2002), em transplantes de pulmão e rins, observou-se também que pacientes com polimorfismos no gene de TLR-4 apresentavam menos episódios de rejeição aguda (Nogueira et al., 2007; Palmer et al., 2003) e em transplantes de pele, mostrou-se que a estimulação de TLR7 era capaz de aumentara rejeição mediada por células T efectoras (Zhong et al., 2008).

Quanto aos mecanismos de rejeição que não são antígeno-específicos, ainda existem muitas questões a serem respondidas, como por exemplo, por que o transplante renal de doadores vivos com complexo de histocompatibilidade principal (MHC) não compatível ao do receptor progride melhor do que o rim de doador-cadáver com MHC compatível, ou por que certos órgãos têm um aceite melhor que outros (Andrade et al., 2005).

Sabe-se que alguns fatores podem contribuir para a perda do enxerto, por exemplo a própria diferença de susceptibilidade à rejeição entre tecidos ou células de diferentes naturezas; a pele, o intestino delgado e pulmões são mais susceptíveis à rejeição, enquanto que ilhotas pancreáticas, coração, rins e fígados são progressivamente melhor aceitos (Davis et al., 1980; Jones et al., 2001; Nash et al., 1977). Além disso, fatores como a vascularização (Gibson e Medawar, 1943; Medawar, 1944) e o tamanho dos enxertos (He et al., 2004). Conforme discutido

anteriormente, muitas das células envolvidas na inflamação possuem um papel duplo. Sendo que a inflamação pode contribuir para a rejeição, no caso de uma resposta com intensa produção de substâncias pró-inflamatórias, mas também pode atuar no processo de reparação tecidual e cicatrização contribuindo para o aceite de enxertos.

O papel da inflamação em transplantes ainda não é muito claro, especialmente no que se refere ao aceite de enxertos. Um trabalho desenvolvido em nosso próprio laboratório mostra que uma regulação apropriada da resposta inflamatória é muito importante para o aceite de enxertos. (Larocca et al., 2008) mostraram que o transplante de peles singênicas em linhagens de camundongos selecionados para máxima (AIR_{MAX}) ou mínima resposta inflamatória aguda (AIR_{MIN}) resultou em melhor aceite em receptores AIR_{MAX} do que em receptores AIR_{MIN} , que não aceitaram totalmente os enxertos.

Ainda existem muitas questões a serem respondidas acerca do papel da imunidade inata no transplante. É importante estudar o contexto inflamatório desenvolvido após o transplante para a melhor compreensão da sua relevância na rejeição dos enxertos.

Neste estudo investigou-se diferenças entre o perfil da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico. Para isso, realizou-se a caracterização fenotípica e funcional das células inflamatórias presentes no enxerto de pele após o transplante alogênico ou singênico em camundongos.

2 OBJETIVOS

O estudo proposto teve como objetivos caracterizar a resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico de pele em camundongos e avaliar a participação da IL-10 na modulação da resposta ao transplante. Mais especificamente os objetivos foram:

1- Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as células inflamatórias que migram ao enxerto, após o transplante singênico ou alogênico, na presença ou ausência de IL-10.

2- Avaliar a participação da IL-10 no doador ou receptor para o aceite ou rejeição de enxertos singênicos ou alogênicos.

3- Avaliar a sobrevivência do enxerto alogênico quando transplantado juntamente com o enxerto singênico em um mesmo receptor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Camundongos machos de 8 à 10 semanas da linhagem BALB/c (H-2^d), C57BI6/IL-10^{+/+} (H-2^b), C57BI6/IL10^{-/-}(H-2^b) e NZW (H-2^z) foram obtidos e mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da universidade de São Paulo. Os animais de experimentação foram mantidos em unidades microisoladoras. Os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em experimentação Animal (CEEA).

3.2 Abordagem experimental

Camundongos BALB/c (H-2^d), C57BI/6 IL-10^{+/+} (H-2^b) e C57BI/6 IL-10^{-/-} (IL-10^{-/-}) foram transplantados com a pele da cauda do doador alogênico NZW (H-2^z) ou singênico. Os animais foram sacrificados e o enxerto foi removido em diferentes períodos após o transplante: 7, 24, 72 horas, 7 ou 9 dias. Para obtenção das células inflamatórias que migraram ao enxerto utilizou-se protocolo descrito em Larocca et al (2008). Os enxertos foram colocados em placas de 48 poços e incubados em 500 µl de meio de cultura completo por 24 horas. Após esse período, as células que emigraram do enxerto foram recolhidas e o sobrenadante da cultura foi analisado quanto à produção de citocinas. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as populações celulares avaliadas por contagem diferencial em lâmina corada após o procedimento de cito-centrifugação ou por análise de citometria de fluxo. No sobrenadante foram dosadas citocinas pró e anti-inflamatórias por meio da técnica de ELISA, e óxido nítrico por GRIESS (Figura 3).

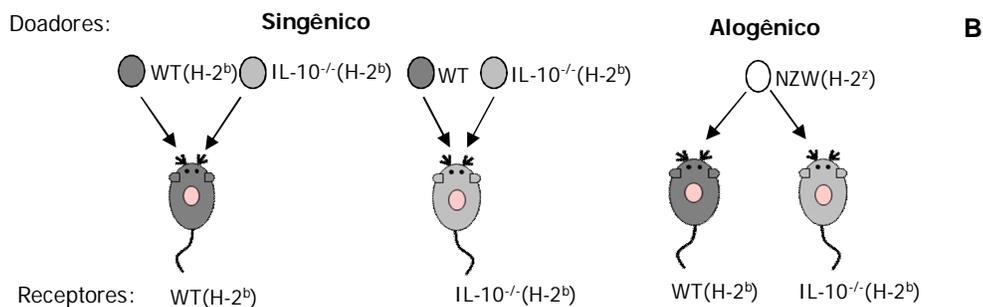
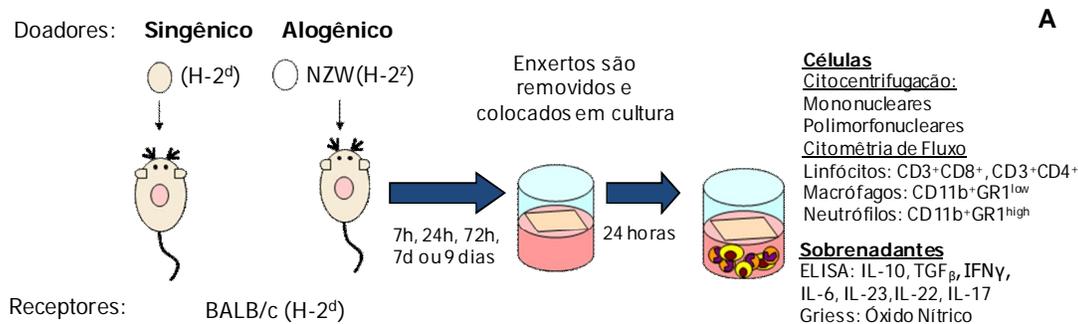


Figura 3- Modelo experimental utilizado. A) Camundongos BALB/c foram transplantados com pele singênica ou alogênica. Em diferentes tempos pós-transplante os enxertos foram removidos e colocados em cultura por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram recolhidas e caracterizadas após citocentrifugação ou citometria de fluxo, a produção de citocinas e nitrito foi medida no sobrenadante das culturas por ELISA e GRIESS, respectivamente. B) Foram realizados transplantes singênicos e alogênicos em animais C57Bl6/IL-10^{-/-} (IL-10^{-/-}) ou C57Bl6/IL-10^{+/+}(WT); nos transplantes singênicos foram transplantadas peles provenientes de camundongos IL-10^{-/-} ou KO, nos transplante alogênico foram transplantadas peles provenientes de camundongos NZW.

Em outros experimentos camundongos foram transplantados simultaneamente com a pele alogênica (NZW) e singênica em seus dorsos ou a pele alogênica foi transplantada 24 horas após a pele singênica. A sobrevida dos enxertos foi acompanhada visualmente e por tato. Deste modo, comparou-se o tempo de rejeição dos enxertos; em camundongos transplantados simultaneamente com o enxerto singênico e alogênico, em camundongos com enxertos transplantados com um intervalo de 24 horas, e em camundongos transplantados com um único enxerto alogênico ou dois enxertos alogênicos (Figura 4).

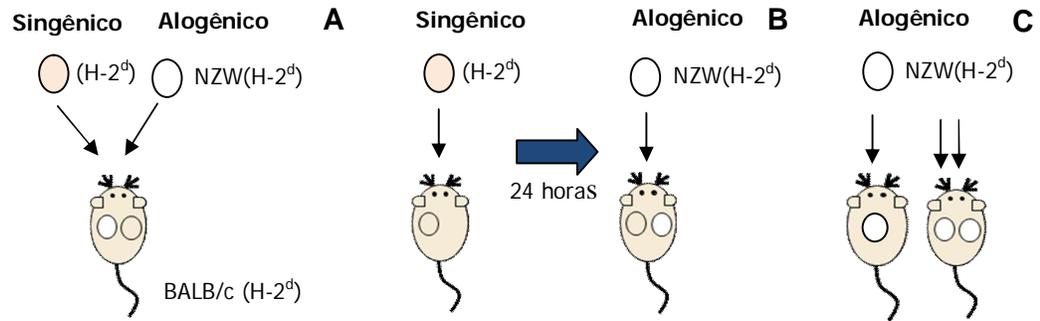


Figura 4- Modelo experimental de transplantes simultâneos. A) Camundongos BALB/c foram transplantados com pele alogênica e singênica simultaneamente. B) Camundongos BALB/c foram transplantados com pele singênica e 24 horas depois a pele alogênica foi transplantada. C) Camundongos foram transplantados com um enxerto alogênico ou dois enxertos alogênicos. A sobrevida dos enxertos foi acompanhada.

3.3 Transplante de pele

A pele da cauda do doador foi removida e cortada em quadrados com cerca de 1cm² sendo seus cantos abaulados com auxílio de bisturi. A pele foi mantida em PBS à temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Os receptores foram anestesiados com 300 µL (via intraperitoneal) de uma solução de cloridrato de ketamina (0,5%) e cloridrato de xilazina (0,3%) em PBS. Em seguida, os animais tiveram seu dorso tricotomizados e a assepsia local foi realizada com etanol 70%. A cama para o enxerto foi preparada removendo-se uma área da derme e epiderme até o nível do músculo intrínseco, no tamanho do enxerto. O enxerto foi colocado na cama e suturado com fio de nylon 6.0 com agulha triangular e o local foi coberto com band-aid. Os enxertos foram monitorados diariamente por exame visual e pelo tato, para análise de seu tamanho, nascimento de pêlos, aderência ao receptor e formação de áreas hemorrágicas e crostas. A rejeição dos enxertos foi estabelecida quando uma área maior ou igual a 80% do tecido havia sido destruída, segundo trabalhos já publicados (Joffre et al., 2008; Kroemer et al., 2008; Peng et al., 2008) .

3.4 Histologia

As lâminas para análise histológica foram confeccionadas pelo Setor de Histologia do Departamento. Para análise histológica, os enxertos foram removidos e fixados por 24 horas em formaldeído e em seguida, incluídos em parafina. Em

seguida foram feitos cortes seriados de 3 μM utilizando aparelho Leica RM 2135 a partir da peça incluída em parafina. Os cortes foram coletados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina para análise patológica ou com Tricrômio de Masson com azul de anilina e fast green para exame de produção de colágeno. Os resultados da coloração hematoxilina-eosina são: núcleos em azul; citoplasma, fibras colágenas, elásticas e neurofibrilas em vermelho. Para Tricrômio de masson: núcleos em negro; citoplasma, fibrina e fibrilas nervosas em vermelho brilhante. Colágeno, cartilagem e muco ácido em azul ou verde (Michalany, 1981).

3.5 Obtenção das células emigrantes do enxerto

Os enxertos foram removidos 7, 24, 72 horas, 7 e 9 dias após o transplante. Cada enxerto foi cortado em 4 partes e colocado em uma placa de 48 poços, em 500 μl de meio completo (DMEM suplementado com 0.1 mM de aminoácidos não essenciais, 0.1mM de vitaminas, 2 mM L-glutamina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, EUA) e 5% de soro fetal bovino (SFB)). Os enxertos foram mantidos em estufa contendo 5% de CO_2 à temperatura de 37°C por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram removidas e contadas e o sobrenadante foi recolhido e estocado para a avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas.

3.6 Tratamento com IL-10 recombinante

Camundongos IL-10^{-/-} transplantados com a pele de IL-10^{-/-} foram tratados diariamente com 500 pg de IL-10 recombinante (obtido através de cultura de células COS transfectadas com IL-10 murino) por 6 dias, sendo essa dose estabelecida a partir dos experimentos em que se mediu produção de IL-10 pelas células emigrantes do enxerto no ponto de 24 horas pós-transplante (Figura 7). O tratamento se deu através de injeções no local do transplante. Foram injetados 100 μL de solução de IL-10 diluído em PBS (5 $\mu\text{g/mL}$) a partir do dia 0.

3.7 Extração de DNA para genotipagem

Camundongos C57Bl6/IL10^{-/-} e camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} tiveram 1 cm de suas caudas cortadas. O material foi congelado em nitrogênio líquido e mantido à temperatura de -80° C até a extração de DNA. Para extração as caudas foram maceradas sobre uma placa de metal gelada e o material foi colocado em eppendorfs com 200 µL de Tampão de lise com proteinase K (Tris 5mM pH=8,0; EDTA 10mM pH=8,0; SDS 0,5%; proteinase K 1,5mg/mL). O material foi incubado por 2 horas à 65° C e após esse período foram acrescentados mais 200 µL de tampão de lise sem proteinase K. As amostras foram centrifugadas à 18000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi recolhido, ao sobrenadante foram acrescentados 800 µL de etanol absoluto gelado+40 µL de acetato de sódio. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 12000 g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 500 µL de etanol 70%, os tubos foram invertidos e deixados a temperatura ambiente por 18 horas para que as amostras secassem, ao fim desse período 200 µL de tampão TE (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, ph=8,0) foi acrescentado às amostras e o DNA foi quantificado.

3.7 Genotipagem

O loci do gene de IL-10 foi amplificado via reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se Taq polimerase, 0,5 mM de *primers* e 1,5 mM de tampão magnésio. A reação constitui-se de 12 ciclos de 94° C por 20 segundos, 64° C por 30 segundos com decréscimo de -0,5° C a cada ciclo e 72° C por 35 segundos, 25 ciclos de 94° C por 20 segundos, 58° C por 30 segundos e 72° C por 35 segundos. O primeiro ciclo precedeu de uma denaturação de 3 minutos a 94° C e o último ciclo foi seguido de um período anelamento de 72° C por 2 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5%.

Peso molecular de *IL-10*= 200bp

Peso molecular de *IL-10*^{-/-}= 450bp

“IL10T 2.2” Anti sense IL-10 primer 5'-GTG GGT ATT GTC TTC CCG-3'

“IL-10T 1.4” Sense IL-10 primer 5'- GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC- 3'

IL-10^{-/-} “NEO 5” anti sense strand 5'- CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG-3'

3.8 Análise de citocinas

A produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante das culturas através da técnica de ELISA “sanduíche”, utilizando-se os “kits” comerciais da Endogen (Woburn, MA, EUA) ou da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA) para a dosagem da IL-10, TGF- β , IFN- γ , IL-6, IL-23, IL-22 e IL-17. Placas duras com propriedade de “alta ligação” (high binding) (Corning- New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 μ l do primeiro anticorpo diluído em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) por 16 horas à 4°C. Após esse período, os poços foram bloqueados por 2 horas com 150 μ l de PBS contendo 10% de soro fetal bovino inativado (SFB). Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-10%SFB e a cada poço foram adicionados 50 μ l das amostras ou do recombinante murino em diluições seriadas, em meio completo. As placas foram incubadas por 3 a 4 horas à temperatura ambiente e após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T (Solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20). Foram adicionados 50 μ l do anticorpo biotilado aos poços e estes foram incubados por um período de 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com PBS-T (3 vezes) e 80 μ l do conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase; Sigma Chemical Co., MO, EUA), na diluição 1:4000 com PBS, foram adicionados e incubados por 1 hora. Após esse período, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e aos poços foram adicionados 100 μ l da solução substrato: 3% de H₂O₂, o cromógeno 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/ml dissolvido em tampão citrato/fosfato (citrato 0,028M e fosfato de sódio 0,044M, pH 5,2). A reação foi interrompida, após aproximadamente 30 minutos, com uma solução 0,2M de ácido cítrico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.9 Dosagem de nitrito de sódio

A determinação indireta da produção de óxido nítrico foi realizada através da produção de nitrito acumulado no sobrenadante da cultura pelo método de Griess. Para isso, amostras ou o padrão NaNO₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em diferentes concentrações que variam entre 1,6 μ M e 50 μ M foram colocados em poços da placa de 96 poços (Corning, NY, EUA) no volume final de 50 μ l. Em seguida

foi adicionado o reagente de Griess (1g de sulfanilamida (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, EUA) , 0,1g de N-(1-naftil) etilenodiamina di-hidroclorado (Sigma Chemicals Co.), 2,5 ml de ácido fosfórico e água destilada q.s.p. 100 ml). As amostras e o padrão foram incubados por 10 minutos em câmara escura, em temperatura ambiente. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, CA., EUA) no comprimento de onda de 540 nm.

3.10 Caracterização de células

3.10.1 Citocentrifugação

As células que emigraram do enxerto foram recolhidas dos poços, contadas e 1×10^5 células e colocadas em caçapas da citocentrífuga (Bio Research) em um volume total de 300 μ L de PBS. As células foram centrifugadas por 4 minutos a 30g. As lamínas foram deixadas para secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foram fixadas em metanol por 30 segundos e coradas com hematoxilina-eosina utilizando-se o kit Protocol Hema 3 (biochemical sciences inc).

3.10.2 Citometria de Fluxo

Para a avaliação da expressão dos receptores de superfície nas células dos camundongos transplantados as células que emigraram dos enxertos foram recolhidas das placas, contadas e ressuspendidas em PBS contendo 3% de SFB, foram então incubadas com o anticorpo anti-CD16/32 purificado (bloqueador do receptor Fc γ II e Fc γ III; Pharmingen, San Diego, CA, EUA) durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo por 30 minutos à 4°C. Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anti-CD3-FITC (145-2C11), anti-CD4-PE ou FITC (RM4-5), anti-CD8-PE ou FITC (53-6.7), todos da Pharmingen, San Diego, CA, EUA. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS/SFB a 3% e fixadas com PBS/paraformaldeído 0,5%. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, EUA), equipado com 15mW laser de argônio e filtros para FITC (530 nm) e PE(585 nm), utilizando-se o software CellQuest (Apple). A região estabelecida para o processamento das amostras,

utilizando-se os parâmetros de dispersão da luz (FSC e SSC), excluirá as hemácias e as células não viáveis. O número de eventos captados será, no mínimo, 10.000.

3.11 Análise Estatística

Para as análises comparativas entre os grupos foi empregado o teste estatístico t de Student; ou o ANOVA paramétrico (teste posterior de Tukey ou Dunnett), quando os dados se aproximaram de uma distribuição Gaussiana. As curvas de sobrevida do enxerto foram comparadas através do teste logrank pelo programa Prisma 4.0. Para todos os testes foi estabelecido o nível de significância de 5%, rejeitando a hipótese da nulidade quando $p < 0,05$. Os dados relativos à sobrevivência do enxerto serão apresentados como mediana do tempo de sobrevida. Os demais resultados serão apresentados como média \pm o desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica e funcional das células do enxerto alogênico e singênico

4.1.1 Caracterização fenotípica

Com o intuito de se avaliar comparativamente a dinâmica de infiltração de células inflamatórias e as populações celulares no transplante de pele alogênico e singênico, camundongos BALB/c foram transplantados com enxertos singênicos ou alogênicos. Os enxertos foram retirados em diferentes tempos após o transplante (24, 72 horas, 7 ou 9 dias) e incubados em meio de cultura completo por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram recolhidas, fenotipadas através da marcação de receptores de superfície com anticorpos fluorescentes direcionados ao GR-1, CD11b, CD3, CD4 ou CD8 (Figura 5A) ou transferidas para lâminas por citocentrifugação e caracterizadas como mononucleares ou polimorfonucleares (Figura 5B).

Comparou-se assim, através de ambos os métodos, a saída de células inflamatórias nos enxertos alogênicos e singênicos.

Ao analisar o número total de células inflamatórias no enxerto alogênico, observou-se um aumento progressivo das mesmas ao longo do tempo (Figura 6A) sendo que o pico de infiltração foi observado no nono dia pós-transplante, período esse em que se já se observa rejeição de enxerto (Figura 6B). Em contrapartida, o pico de infiltração celular no enxerto singênico ocorreu no tempo de 24 horas, decrescendo ao longo do tempo pós-transplante. No sétimo e nono dias pós-transplante, conforme pode ser observado na figura 6C houve maior infiltrado celular nos enxertos alogênicos quando comparados aos enxertos singênicos.

Segundo o trabalho de Lagasse e Weissman (Lagasse e Weissman, 1996), as células polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos foram caracterizados pela alta expressão de GR-1 (GR-1^{high}) e expressão baixa ou negativa da molécula GR-1 (GR-1^{neg-low}) na população CD11b⁺, respectivamente (Figura 6C-D). Durante todo o período pós-transplante tanto no transplante alogênico quanto singênico, foi verificado que a população de células inflamatórias é composta majoritariamente por neutrófilos (células GR1^{high} CD11b⁺), não sendo observadas diferenças entre as porcentagens de neutrófilos nos transplantes alogênicos e singênicos em nenhum dos pontos avaliados (Figura 6C).

Embora não tenha sido encontrada diferença na porcentagem de neutrófilos em nenhum momento quando os enxertos alogênicos e singênicos foram comparados entre si, o número de células PMN mostrou-se diferente. O número de neutrófilos no enxerto alogênico ainda se encontra elevado nos sétimo e nono dias pós-transplante ($33,63 \pm 7,20$ e $36,22 \pm 72,34 \times 10^4$ células, respectivamente), enquanto que no transplante singênico há apenas $12,89 \pm 3,45 \times 10^4$ e $3,95 \pm 1,72 \times 10^4$ células no sétimo dia e no nono dia, respectivamente (Figura 6C).

Quanto à população de macrófagos (células $GR1^{neg-low}CD11b^+$), houve aumento da porcentagem dessa população conforme a progressão do tempo pós-transplante. No transplante singênico, essa população compunha inicialmente 5,9% da população total aumentando para 39,4% no nono dia. No transplante alogênico também ocorreu aumento da porcentagem de macrófagos ao longo do tempo, no ponto de 7 horas essa população representava 5% e no nono dia passou a representar 24,9% da população total (Figura 6D).

Analisando o número de macrófagos no transplante singênico o pico de infiltração dessas células foi de $6,53 \pm 2,08 \times 10^4$ células em 72 horas, reduzindo-se para $1,48 \pm 0,25 \times 10^4$ células no nono dia. No transplante alogênico ocorreu aumento progressivo de macrófagos ao longo do tempo, isto é, foram observadas $0,47 \pm 0,11 \times 10^4$ células 7 horas pós-transplante sendo que no dia 9 esse número aumentou para $12,57 \pm 2,83 \times 10^4$ (Figura 6D).

Comparando o transplante singênico e alogênico quanto à presença de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e T $CD3^+CD8^+$ nos enxertos, verificou-se que estas populações aumentaram nos enxertos alogênicos no sétimo e nono dia pós-transplante. Antes desses pontos essas populações celulares apresentaram-se em quantidades baixas tanto nos enxertos singênicos quanto alogênicos.

Outro ponto observado foi a quantidade de células T $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ nos enxertos. No transplante alogênico foram encontrados $10,50 \pm 0,80 \times 10^3$ e $16,20 \pm 3,40 \times 10^3$ células T $CD3^+CD4^+$ em 7 dias e 9 dias, respectivamente, enquanto que as células T $CD8^+$ foram encontradas em quantidades menores em relação às T $CD4^+$: apenas $4,41 \pm 0,38 \times 10^3$ e $8,06 \pm 0,30 \times 10^3$ células T $CD3^+CD8^+$ para os mesmos tempos pós-transplante (Figura 6E e F).

No transplante singênico ocorreu um aumento do número de células T $CD3^+CD4^+$ no sétimo dia, dia no qual foram encontradas $5,58 \pm 1,37 \times 10^3$ células; no nono dia esse número caiu para $1,55 \pm 0,30 \times 10^3$. Em comparação com o número de

células T CD3⁺CD4⁺, o número de células T CD3⁺CD8⁺ encontrados no sétimo e nono dia foram mais baixos, foram encontrados respectivamente $0,71 \pm 0,01 \times 10^3$ e $1,41 \pm 0,03 \times 10^3$ células T CD3⁺CD8⁺ (Figuras 6E e F).

Nesta série de experimentos, concluímos que até o ponto de 72 horas pós-transplante há número similar de células inflamatórias nos transplantes singênicos e alogênicos. No entanto, partir do sétimo dia pós-transplante, observa-se aumento de células no enxerto alogênico e diminuição no singênico. Também verificamos que os neutrófilos representam a parcela majoritária do infiltrado celular do enxerto e que a porcentagem de macrófagos aumenta conforme o tempo.

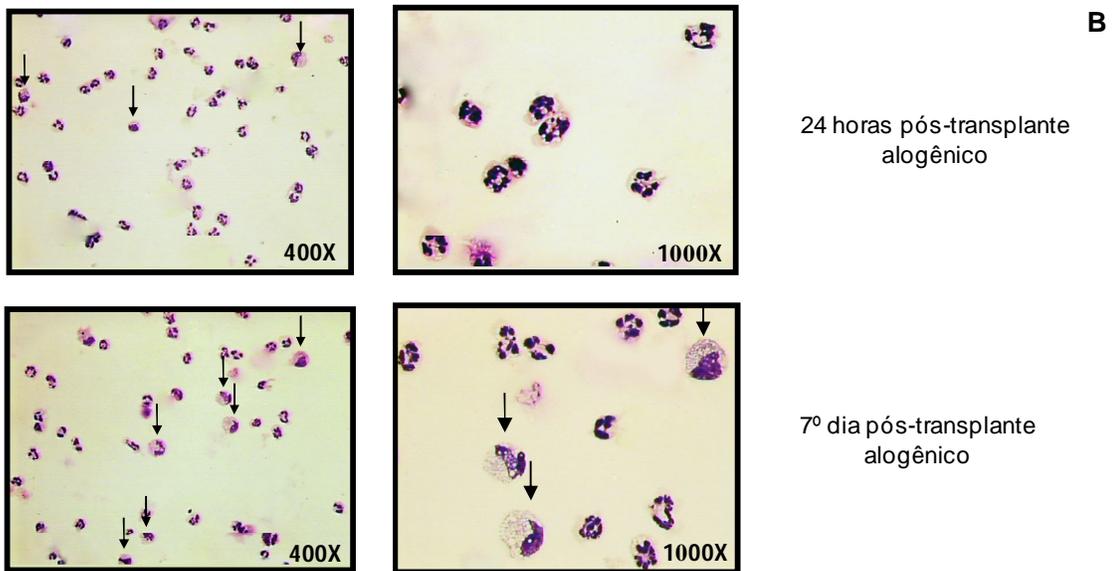
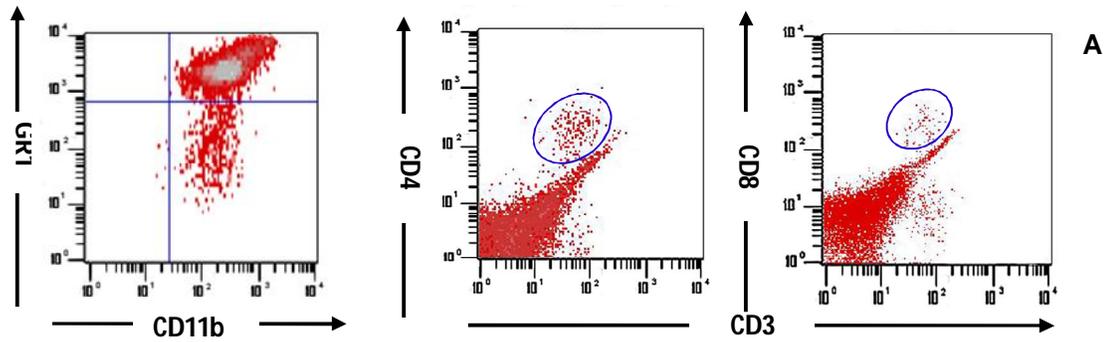


Figura 5- Fenotipagem de células emigrantes do enxerto. Em diferentes tempos pós-transplante (24h, 72h, 7dias) os enxertos foram removidos e colocados em cultura, as células foram recolhidas e caracterizadas como polimorfonucleares ou mononucleares. A- Representação da população de neutrófilos ou macrófagos através da expressão dos marcadores de superfície GR1^{high}CD11b⁺ ou GR1^{neg-low}CD11b⁺. B- Imagens de células emigrantes do enxerto 24 horas e 7 dias pós-transplante, lâminas obtidas por citocentrifugação, setas apontam para células mononucleares, coloração hematoxilina-eosina. Resultados representativos de 3 experimentos.

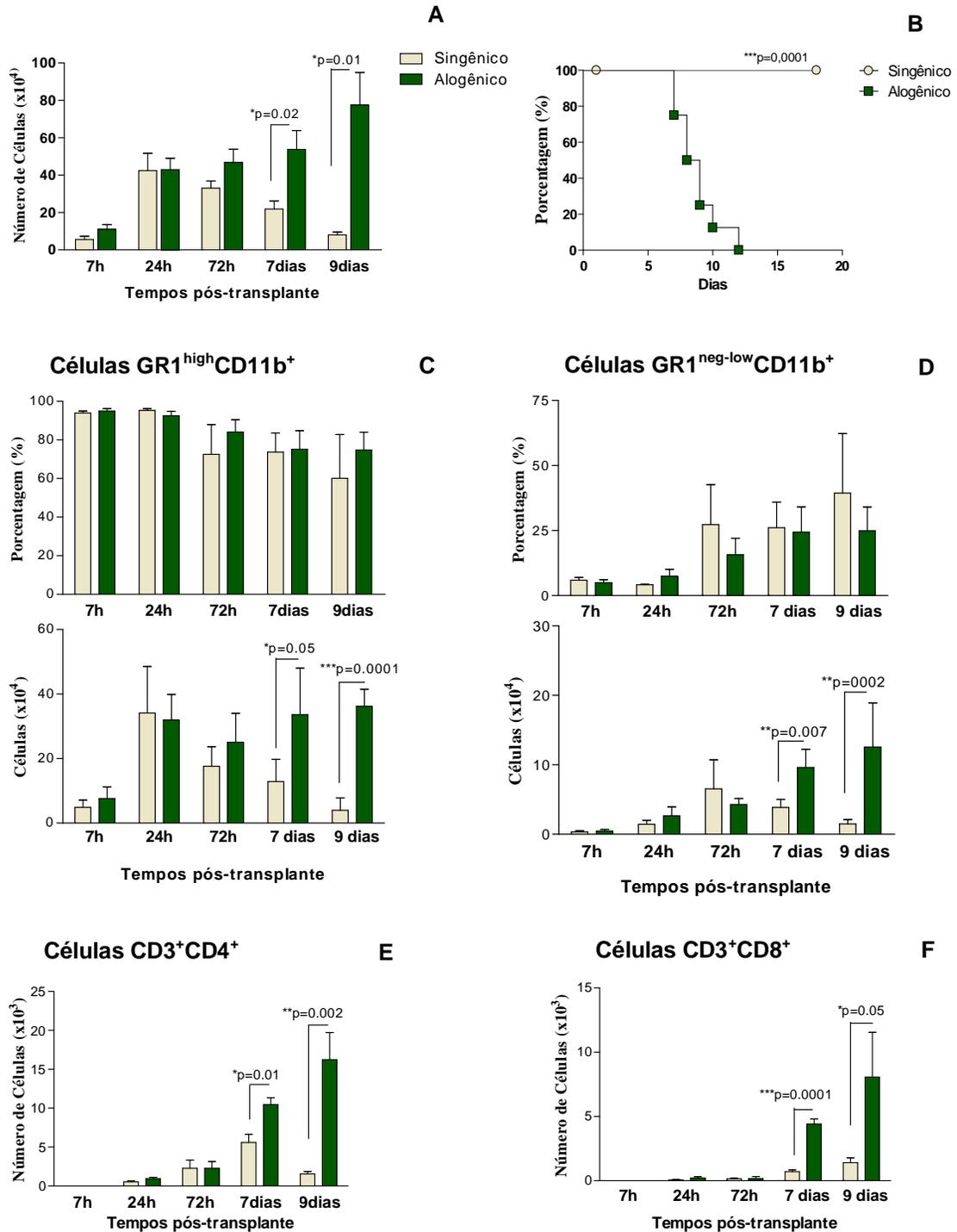


Figura 6- Representação das células inflamatórias presentes nos enxertos. A) Representação do número total de células infiltrantes do enxerto após 7h, 24h, 72h, 7 ou 9 dias do transplante, após transplantes alogênicos (■) ou singênicos (□). B) Sobrevida de enxertos alogênicos (■) ou singênicos (○), n=8. C) Número total e Porcentagem de células GR1^{high} CD11b⁺ D) Número total e porcentagem de células GR1^{neg-low} CD11b⁺ E) Número total de células CD3⁺CD4⁺. F) Número total de células CD3⁺CD8⁺. Valores expressos em média±desvio padrão (n=4/animais ponto). Resultados de 3 experimentos independentes.

4.1.3 Caracterização funcional: produção de citocinas e óxido nítrico

Com o intuito de se avaliar comparativamente o aspecto funcional das células do enxerto alogênico e singênico, quantificou-se a produção de citocinas (método de ELISA) e óxido nítrico (método de GRIESS) no sobrenadante das células emigrantes do enxerto. Foi avaliada a produção de IL-10, IFN γ e devido a presença de grandes quantidades de neutrófilos nos enxertos, foram dosadas também citocinas envolvidas na geração das células Th17 como o TGF β e a IL-6; a IL-23 que tem função importante na manutenção dessa população, e as citocinas efetoras das células Th17: IL-17 e IL-22 (Weaver et al., 2007).

Observou-se que tanto no transplante alogênico quanto no singênico houve produção de TGF β em quase todos os tempos pós-transplante. No transplante singênico a produção de TGF β foi de 1667,25 \pm 38,81pg/mL no ponto de 7 horas; esta produção aumentou ao longo do tempo atingindo seu pico no sétimo dia, quando foram produzidos 3050,00 \pm 502,64pg/mL e no nono dia a produção dessa citocina reduziu-se para 1996,00 \pm 237,68pg/mL. No transplante alogênico a produção de TGF β também apresentou aumento de 1830 \pm 50,78pg/mL no ponto de 7 horas, para 4139,00 \pm 420,68pg/mL no sétimo dia. Entretanto essa produção diminuiu drasticamente no nono dia pós-transplante, quando esta encontrou-se diminuída em relação à produção no enxerto singênico (Figura 7A).

A produção de IL-6 foi maior no transplante alogênico em praticamente todos os tempos pós-transplante, com exceção do ponto de 9 dias em que a produção foi semelhante em ambos grupos. É interessante observar que houve uma tendência à maior produção de IL-6 no transplante alogênico entre 7 e 72 horas (Figura 7B).

A produção de IL-23 também foi analisada, sendo que no transplante alogênico ocorreu produção significativamente maior do que no transplante singênico. Enquanto que no transplante singênico houve pequena produção de apenas 61,00 \pm 72,12pg/mL no ponto 24 horas, este mesmo ponto representou o pico de produção de 267,00 \pm 63,5pg/mL do transplante alogênico; além disso, ocorreu produção do composto no ponto de 7 e 72 horas também (Figura 7C).

A produção de IL-17 no transplante alogênico ocorreu entre 72 horas e 9 dias, sendo que dentro deste período ocorreu aumento de produção de 56,00 \pm 65,28pg/mL para 221,50 \pm 26,61pg/mL no nono dia. Esta produção foi sempre maior quando comparada ao transplante singênico, uma vez que no transplante singênico só

ocorreu produção desta citocina no sétimo dia e esta produção foi baixa quando comparada ao mesmo ponto do transplante alogênico (Figura 7D).

Quanto à produção de IL-22, não foi detectada produção desta citocina nos enxertos singênicos ou alogênicos entre os pontos de 7 horas e 72 horas. No entanto, mostrou-se alta de IL-22 no sétimo e nono dia pós-transplante alogênico em relação ao transplante singênico (Figura 7E).

Com relação à produção de IFN γ , no transplante singênico esta manteve-se baixa em todos os pontos sendo que o nível máximo de produção dessa citocina foi $652,16 \pm 457,77$ pg/mL, no dia 9 pós-transplante. No transplante alogênico a produção dessa citocina manteve-se baixa entre 7 e 72 horas pós-transplante, com produção média de apenas $112,60 \pm 177,8$ pg/mL; porém no sétimo dia pós-transplante houve grande produção de IFN γ atingindo o pico de $3993,77 \pm 1260$ pg/mL, no nono dia a produção de IFN γ ainda manteve-se alta sendo detectados $2066,57 \pm 527,36$ pg/mL no sobrenadante da cultura (Figura 7F).

Quanto à produção de IL-10, verificou-se que no tempo de 7 horas não houve diferenças entre o transplante alogênico e singênico, porém houve uma tendência de maior produção do composto no enxerto singênico. No ponto de 24 horas essa tendência foi confirmada ocorrendo maior produção de IL-10 no transplante singênico em relação ao transplante alogênico: $136,14 \pm 17,61$ pg/mL e $60,37 \pm 5,25$ pg/mL, respectivamente. Em seguida, no ponto de 72 horas foi observada uma inversão na produção de IL-10 sendo que as células do enxerto alogênico passaram a produzir níveis mais elevados de IL-10 do que as células do transplante singênico (Figura 7G).

No transplante singênico, a produção de óxido nítrico não foi detectada antes de 72 horas. Nesse período foram produzidos $3,60 \pm 0,38$ μ M/mL de nitrito e observou-se uma queda de produção no sétimo dia ($2,88 \pm 1,04$ μ M). No dia 9 pós-transplante a queda foi ainda maior, com produção de $0,39 \pm 0,34$ μ M/mL. Já no transplante alogênico a produção desse composto foi sempre maior quando comparada ao transplante singênico. Para os 3 tempos descritos foi detectada produção de $7,38 \pm 1,88$ μ M/mL; $13,73 \pm 2,78$ μ M/mL e $5,47 \pm 1,78$ μ M/mL, respectivamente (Figura 7H).

Esses resultados mostram uma dinâmica de produção diferencial de IL-10 e citocinas pró-inflamatórias já nas primeiras 24 horas pós-transplante quando os transplantes alogênicos e singênicos são comparados. Esses dados sugerem que a amplificação da resposta inflamatória observada no transplante alogênico pode ser consequência de menor modulação da mesma, ao contrário do que se observa no

transplante singênico, onde a IL-10 é precocemente produzida em maiores quantidades sendo esta candidata a citocina reguladora nesse modelo.

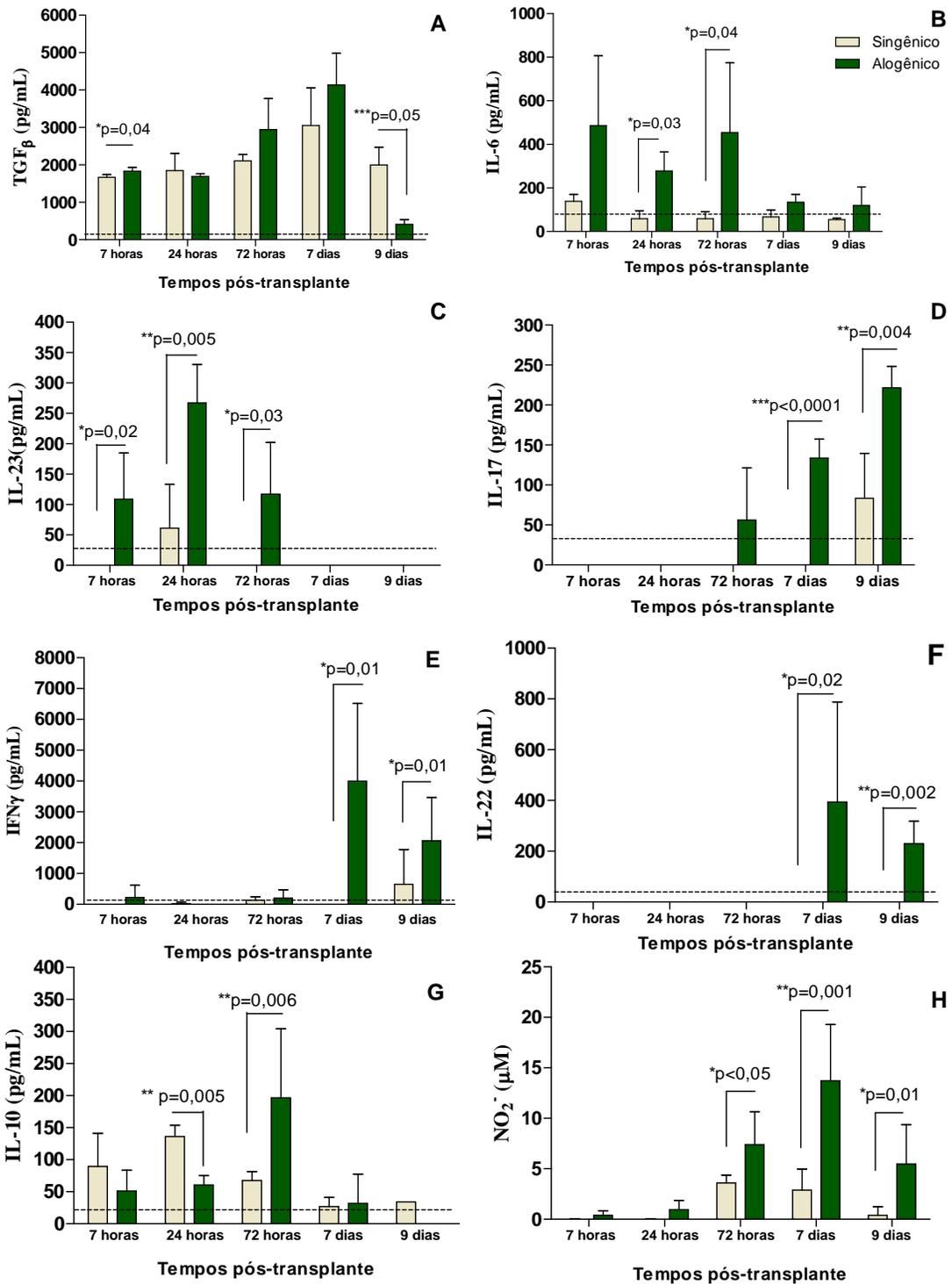


Figura 7- Produção de citocinas e nitrito no sobrenadante de culturas de enxertos removidos em diferentes tempos pós-transplante alogênico ■ ou singênico □. Os enxertos foram cultivados por 24horas em 500 μ L de meio completo e as citocinas avaliadas por ELISA. Produção de TGF β (A); IL-6 (B); IL-23 (C); IL-17 (D); IL-22 (E) IFN γ (F); IL-10 (G) e nitrito(H). Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=4 animais/ponto). Resultados representativos de 3 experimentos independentes.

4.2 Avaliação da influência da IL-10 na progressão do transplante singênico e alogênico

4.2.1 Sobrevida de enxertos alogênicos e singênicos em combinações doador-receptor IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-} ou IL-10^{+/+} → IL-10^{+/+}

Os resultados anteriores mostraram que no enxerto singênico houve produção de IL-10 em todos os tempos pós-transplante e, comparado ao transplante alogênico, houve maior produção dessa citocina no transplante singênico no ponto de 24 horas, sugerindo que a produção da IL-10 nos tempos iniciais pós-transplante possui um papel importante para o aceite da pele singênica. Dessa forma, resolveu-se investigar a influência dessa citocina na progressão do transplante alogênico e singênico. Para isso, camundongos C57Bl6/IL10^{+/+} (WT) e C57Bl6/IL-10^{-/-} (IL-10^{-/-}) foram transplantados com a pele de camundongos NZW ou com a pele de animais WT ou IL-10^{-/-}, respectivamente, segundo o desenho experimental explicitado em material e métodos (Figura 3).

Os resultados mostram que há diminuição da sobrevida do enxerto alogênico, quando o receptor é deficiente de IL-10, em relação aos receptores IL-10 competentes (Figura 8A). Em relação ao transplante singênico, foi interessante observar que na ausência completa de IL-10 no receptor e no doador (IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-}), 61% dos camundongos não aceitaram o enxerto, enquanto 100% dos camundongos C57Bl6/IL10^{+/+} transplantados com enxertos C57Bl6/IL10^{+/+} (WT→WT) foram aceitos (Figura 8B).

Outro fato relevante a ser considerado é que a área do tecido singênico não foi totalmente aceita nos animais C57Bl6/IL-10^{-/-}, apenas cerca de 20% do total de tecido transplantado foi aceito nestes animais. Além disso, em exame macroscópico, também foi observado que estes enxertos possuíam aspecto fibrosado em comparação ao tecido aceito nos animais controle (Figura 8C).

Cortes histológicos destes enxertos foram corados com tricômio de massom para que fossem analisadas a deposição e disposição das fibras de colágeno nestes cortes. Através da análise histológica do tecido singênico aceito nos receptores C57Bl6/IL-10^{-/-}, observou-se junção dermo-epidermal linear, epiderme mais espessa e queratinizada e diminuição ou quase ausência de glândulas. Por outro lado, nos

receptores IL-10 competentes observou-se papilas dérmicas e organização frouxa e em rede das fibras de colágeno, típicas de peles normais (Eming et al.).

Esses dados sugerem que a IL-10 tem um papel crucial na sobrevida de transplantes, pois na ausência dessa citocina a sobrevida do enxerto alogênico é menor em relação aos animais controle. Além disso, a IL-10 também é importante para a sobrevida de enxertos singênicos, visto que na ausência de IL-10, grande porcentagem dos camundongos não aceitou os enxertos ou ainda, a área da pele transplantada não foi completamente incorporada e apresentaram aspecto de fibrose. A destruição do tecido singênico na ausência da IL-10 indica que há grande contribuição do processo inflamatório para a rejeição de enxertos. Esses dados apontam para a importância da IL-10 na modulação da resposta inflamatória e seu papel crucial na aceitação de enxertos singênicos.

4.2.2 Sobrevida de enxerto singênico em combinações doador-receptor IL-10^{+/+} → IL-10^{-/-} ou IL-10^{-/-} → IL-10^{+/+}

Para melhor compreender o papel da IL-10 no aceite do enxerto singênico resolveu-se investigar se a fonte de produção de IL-10 poderia influenciar de modo diferencial o aceite do enxerto. Para isso, foram realizados experimentos em que a pele proveniente de doador IL-10 competente foi transplantada em receptor deficiente de IL-10. Em outros experimentos, camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} foram receptores da pele proveniente de doador C57Bl6/IL-10^{-/-}.

Como pode ser visto na figura 8B, enquanto 85% dos enxertos pertencentes a doadores selvagens transplantados em animais C57Bl6/IL-10^{-/-} foram aceitos (WT→IL-10^{-/-}), apenas 40% dos enxertos de doadores C57Bl6/IL-10^{-/-} foram aceitos em animais selvagens (IL-10^{-/-}→WT). Foi visto também que a ausência de IL-10 no doador resultou em enxertos que não foram completamente aceitos; nestes animais em média apenas 27% do total de área do tecido transplantado foi aceito. Em contrapartida, quando a pele transplantada provinha de animais IL-10 competentes ocorreu melhora no aceite dos enxertos, em média 59% da área total do tecido transplantado foi aceito muito embora o receptor fosse C57Bl6/IL-10^{-/-} (Figura 8C).

Para melhor avaliar o aspecto destes enxertos foram realizadas análises histológicas em lâminas coradas com tricrômio de masson. Como pode ser observado na figura 9C, os enxertos IL-10^{-/-} transplantados em receptores selvagens apresentaram aspecto muito semelhante aos transplantes realizados na ausência completa de IL-10 (IL-10^{-/-}→WT e IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}, respectivamente), isto é espessamento da epiderme e junção dermo-epidermal linear. Observou-se também grande deposição de colágeno, mas aparentemente em menor intensidade do que na ausência completa de IL-10 (IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}).

Quando peles de doadores C57Bl6/IL10^{+/+} foram transplantadas em receptores C57Bl6/IL-10^{-/-} (WT→IL-10^{-/-}), os enxertos apresentaram aspecto semelhante a um epitélio íntegro com papilas dérmicas, epiderme fina e disposição de fibras de colágeno em forma de rede, embora se tenha observado deposição levemente aumentada de colágeno (Figura 9C).

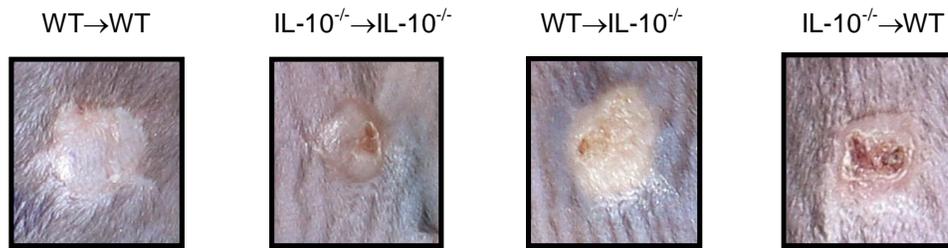
Em seguida, sabendo-se que a manipulação genética da qual os animais C57Bl6/IL-10^{-/-} são provenientes talvez resultasse em alterações que poderiam ter

influenciado os resultados obtidos, foram realizados experimentos para se descartar a possibilidade de que a rejeição das peles ocorreria devido às características intrínsecas nos animais transgênicos e não necessariamente devido à ausência de IL-10. Para isso, camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-} transplantados com pele IL-10^{-/-} foram tratados diariamente com IL-10 recombinante no local do transplante durante 6 dias. O tratamento com IL-10 resultou na melhora significativa no aceite dos enxertos. Observou-se que em média, 33% da área do enxerto foi aceita enquanto que os enxertos não-tratados não obtiveram sequer 1% de área aceita (Figura 10).

Com intuito de se certificar que os animais IL-10^{-/-} utilizados nos experimentos não produziam IL-10, macrófagos intraperitoneais de animais IL-10^{-/-} transplantados e de animais *naïve* (BALB/c e C57Bl/6) foram cultivados por 72 horas sob estímulo ou não de LPS. Não se observou produção detectável de IL-10 por macrófagos dos animais IL-10^{-/-}, conforme esperado, enquanto que macrófagos dos animais selvagens produziram altas quantidades de IL-10, especialmente sob estímulo de LPS (Figura 11A). Interessante a observação de que os macrófagos de animais IL-10^{-/-} transplantados com a pele de camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} também não mostraram níveis detectáveis dessa citocina. Esses dados sugerem que macrófagos produtores de IL-10 presentes no enxerto permanecem no local do transplante e possivelmente não migram para a periferia. Outro método utilizado para a certificação dos animais transgênicos utilizados foi o PCR para o gene de IL-10, para este fim alguns camundongos C57Bl6/IL10^{-/-} ou C57Bl6/IL10^{+/+} utilizados nos grupos experimentais tiveram parte de suas caudas cortadas e estas foram utilizadas para extração de DNA. Foi visto que a banda obtida nos animais C57Bl6/IL10^{-/-} utilizados de fato corresponde à banda de 450bp como esperado nos animais transgênicos enquanto os animais C57Bl6/IL10^{+/+} apresentaram bandas de 200bp, segundo descrito pela Jackson Laboratory de onde os animais foram obtidos (JAX, 2008; Laboratory, 2008)(Figura 11B).

Esses dados indicam que a IL-10 produzida por células residentes da pele do doador possui um papel essencial no aceite de enxertos. A ausência dessa citocina na pele transplantada acarreta em maior destruição e fibrose do tecido transplantado.

12º Dia pós-transplante

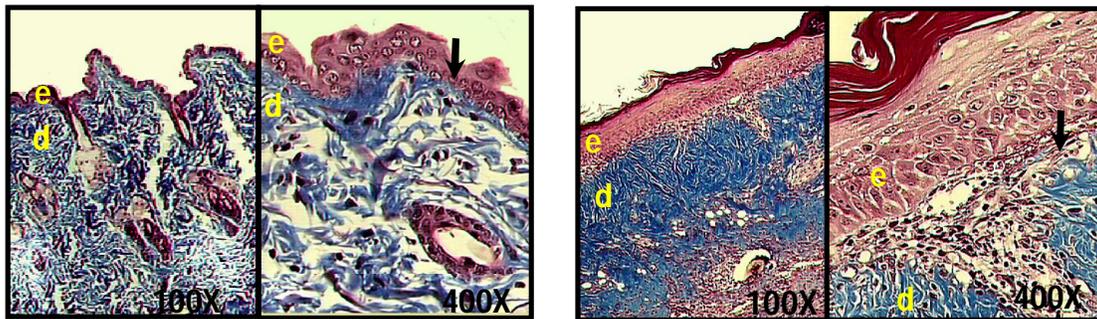


A

WT→WT

IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}

B



WT→IL-10^{-/-}

IL-10^{-/-}→WT

C

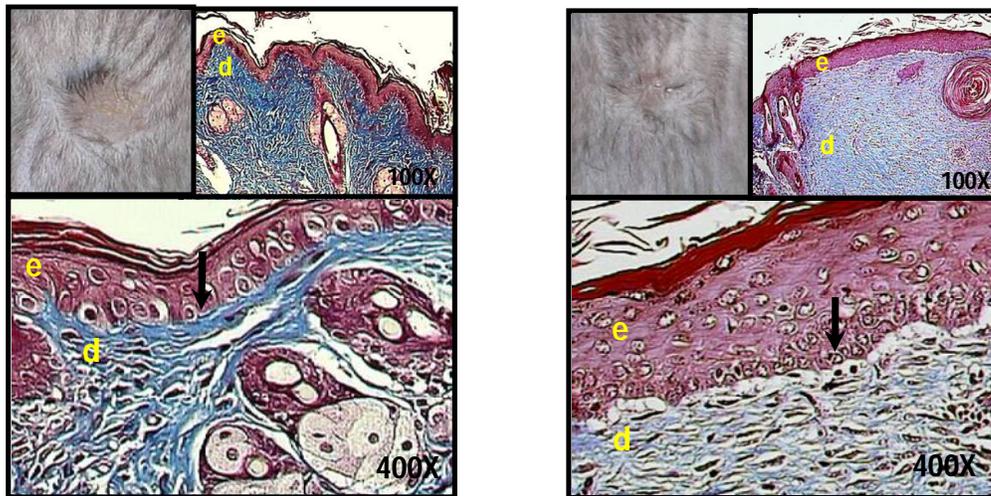


Figura 9- Aspecto macroscópico e cortes histológicos dos enxertos. A- Aspecto macroscópico de transplantes singênicos no 12ºdia pós-transplante. B- Corte histológico do enxerto, na presença de IL-10 no receptor e no doador (WT→WT) ou na ausência completa de IL-10 (IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}) no 12ºdia pós-transplante. C- Corte histológico do enxerto, na presença de IL-10 somente no doador (WT→IL-10^{-/-}) ou somente no receptor (IL-10^{-/-}→WT) no 30ºdia pós-transplante; coloração em tricrômio de massom: núcleos em negro; citoplasmas, fibrina e fibrilas nervosas em vermelho; colágeno em azul. e-epiderme, d- derme, ↓ aponta para junção dermo-epidermal.

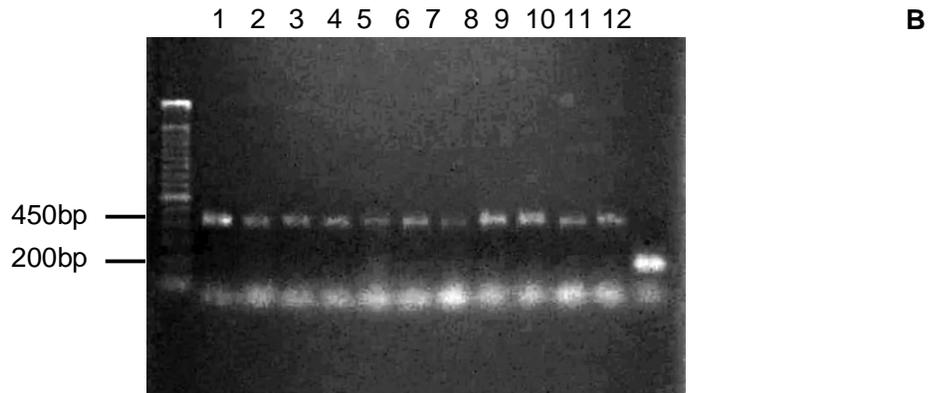
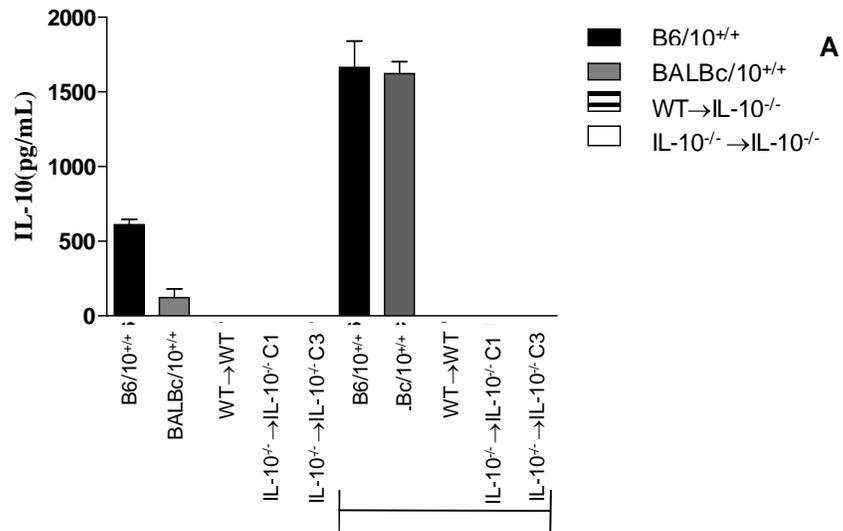


Figura 11- Produção de IL-10 e genotipagem de camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} ou C57Bl6/IL-10^{-/-}. A- Macrófagos intraperitoneais de camundongos C57Bl6/6 ■, BALB/c ■ e animais IL-10^{-/-} transplantados com pele IL-10^{-/-} □ ou pele de B6 ▨ foram recolhidos e estimulados ou não com LPS e a produção de IL-10 foi quantificada. B- Figura representativa de gel com produtos de PCR para o gene de IL-10, linhas 1 a 11 representam camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-} e linha 12 representa camundongo C57Bl6/IL-10^{+/+}.

4.2.3 Caracterização de células inflamatórias

4.2.3.1 Caracterização de células inflamatórias no transplante alogênico

Para examinar se havia diferença na frequência e tipo de células inflamatórias no transplante do enxerto alogênico entre receptores C57Bl6/IL-10^{-/-} e C57Bl6/IL-10^{+/+}, os camundongos tiveram os enxertos removidos 24 horas, 72 horas e 7 dias após o transplante e colocados em cultura por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram identificadas como neutrófilos (CD11b⁺GR-1^{high}), macrófagos (CD11b⁺GR-1^{low}) e células T CD3⁺CD4⁺ ou células T CD3⁺CD8⁺.

Foi verificado que tanto nos enxertos alogênicos transplantados nos animais C57Bl6/IL-10^{+/+} quanto nos enxertos alogênicos transplantados em animais C57Bl6/IL-10^{-/-} ocorreu aumento do número de células totais ao longo do tempo, sendo que o pico de emigração celular ocorreu no sétimo dia pós-transplante em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças no número de células emigrantes do enxerto entre os grupos em nenhum dos pontos avaliados (Figura 12A).

Em seguida avaliou-se a porcentagem e o número de células GR1^{high}CD11b⁺ presentes no enxerto. Foi visto que a população de neutrófilos representa a porcentagem majoritária de células inflamatórias presentes no enxerto em todos os pontos avaliados em ambos os grupos. No sétimo dia pós-transplante, foi observado que a porcentagem destas células é maior no grupo C56Bl6/IL-10^{+/+} em relação ao grupo C57Bl6/IL-10^{-/-}. Em relação ao número de neutrófilos, existe um aumento do número de células ao longo do tempo pós-transplante, sendo no sétimo dia o pico de infiltração celular em ambos os grupos. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em relação ao número de neutrófilos nos diferentes tempos pós-transplante (Figura 12B).

Do mesmo modo que a população de neutrófilos foi analisada, também foram analisados a porcentagem e número de macrófagos nos enxertos. A porcentagem de macrófagos nos enxertos dos camundongos C56Bl6/IL-10^{+/+} não sofre variações significativas entre 24 horas e 7 dias pós-transplante, em contrapartida nos camundongos C56Bl6/IL-10^{-/-} existe um aumento da porcentagem dessa população entre 24 horas e 7 dias pós-transplante. Avaliando o número de macrófagos nos grupos, foi visto que existe um aumento de macrófagos no sétimo dia pós-transplante

tanto nos camundongos C56Bl6/IL-10^{+/+} quanto nos camundongos C56Bl6/IL-10^{-/-}, no entanto não foram observadas diferentes estatísticas entre os grupos.

Quanto ao número de células T CD3⁺CD4⁺ e células T CD3⁺CD8⁺ presentes nos enxertos, observou-se aumento significativo de ambos tipos celulares entre 24 horas e o sétimo dia pós-transplante tanto nos camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} quanto nos camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-}. Quando comparados os grupos observou-se diferença significativa somente no ponto de 24 horas, ponto em que foi encontrado maior número de células T CD3⁺CD8⁺ nos camundongos IL-10 deficientes (IL-10^{-/-}) em relação aos camundongos IL-10 competentes (WT) (Figura 12E).

O conjunto desses dados mostra que não existem diferenças significativas entre o número de células encontrados nos enxertos alogênicos de camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+} e C57Bl6/IL-10^{-/-}, com exceção do ponto de 24 horas em que há maior número de células T CD3⁺CD8⁺ nos camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-}. Esses resultados indicam que a rejeição acelerada do enxerto alogênico nos camundongos IL-10 deficientes provavelmente não ocorre devido ao aumento de células inflamatórias no enxerto, mas por outro mecanismo.

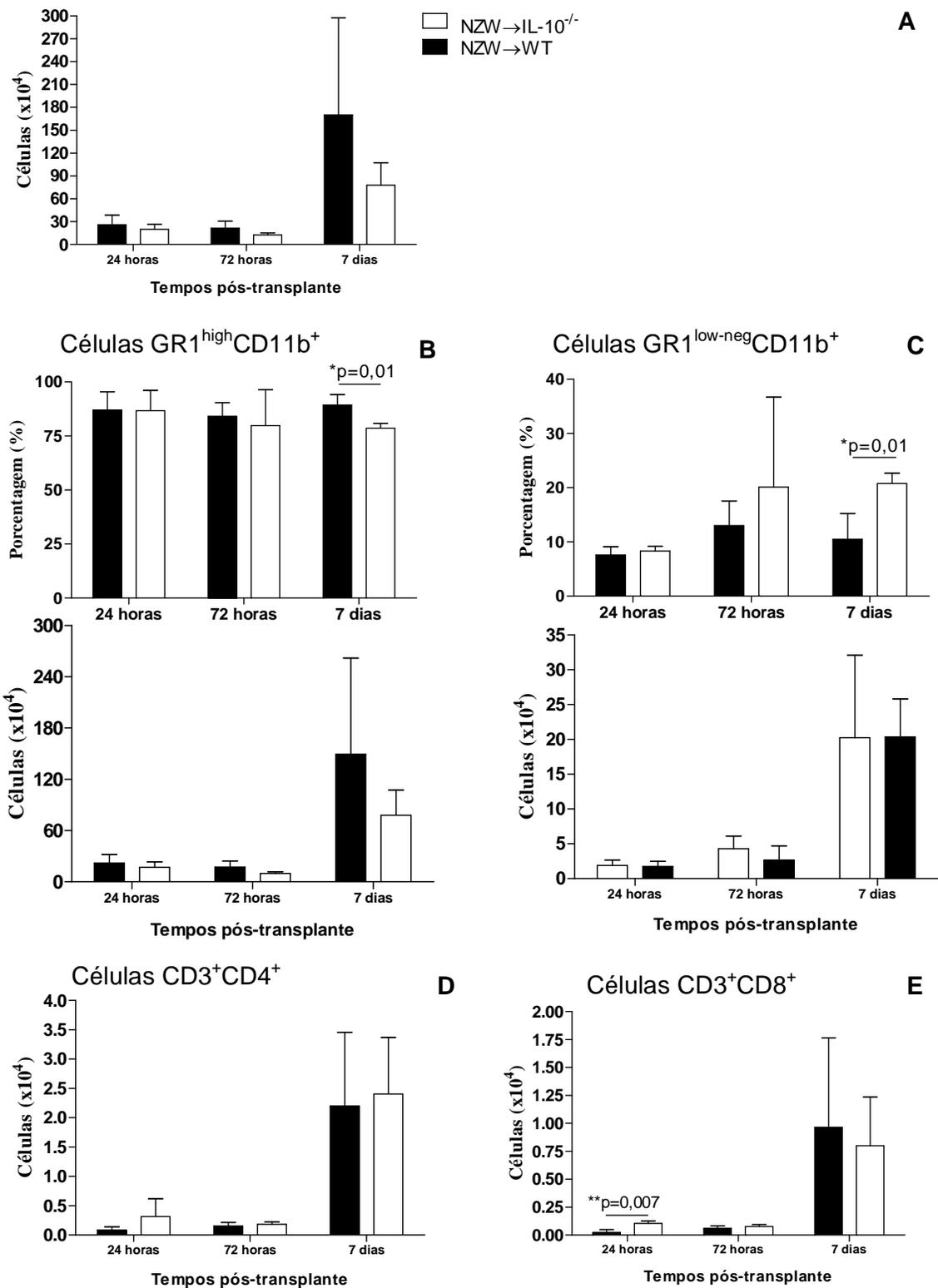


Figura 12- Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplantes alogênicos em animais C57Bl6/IL10^{-/-} (NZW→IL-10^{-/-}) □ ou controles C57Bl6/IL-10^{+/+} (NZW→WT) ■. A- Representação do número total de células infiltrantes do enxerto. B- Número total e Porcentagem de células CD11b⁺GR1^{high}. C- Número total e porcentagem de células CD11b⁺GR1^{low}. D- Número total de células CD3⁺CD4⁺. E- Número total de células CD3⁺CD8⁺. Valores expressos em média±desvio padrão, n=4.

4.2.3.2 Caracterização de células inflamatórias no transplante singênico em combinações doador-receptor IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-} ou IL-10^{+/+} → IL-10^{+/+}

Para examinar se havia diferença na frequência e tipo de células inflamatórias no transplante singênico na total ausência de IL-10 (IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}) ou no controle IL-10 competente (WT→WT), os enxertos foram removidos 24 horas, 72 horas e 7 dias após o transplante e colocados em cultura por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram identificadas como neutrófilos (CD11b⁺GR-1^{high}), macrófagos (CD11b⁺GR-1^{low}) e células T CD3⁺CD4⁺ ou células T CD3⁺CD8⁺.

Foi visto que no tempo de 24 e 72 horas, o número de células no enxerto de pele proveniente de camundongos IL-10^{-/-} foi menor em relação aos controles; no entanto no sétimo dia houve grande aumento no número de células inflamatórias no transplante IL-10^{-/-}, sendo esta saída maior em relação ao controle (Figura 13A).

Tanto no controle quanto no enxerto IL-10^{-/-}, os neutrófilos representaram a porcentagem majoritária do infiltrado celular e por isso sua dinâmica de infiltração no enxerto refletiu os dados anteriores em relação ao número total de células. Isto é, observou-se menor número de células no enxerto IL-10^{-/-} em relação ao controle entre 24 e 72 horas e aumento do número de células no sétimo dia. No sétimo dia foram encontradas $124,84 \pm 62,28 \times 10^4$ células nos camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-} enquanto nos camundongos IL-10 competentes foram encontradas somente $31,10 \pm 25,11 \times 10^4$ células (Figura 13B).

Quanto à população de macrófagos foi visto que ocorreu aumento do número e porcentagem dessas células ao longo do tempo pós-transplante, tanto no enxerto de camundongos controle quanto nos animais IL-10^{-/-}. No transplante IL-10^{-/-} ocorreu aumento de $2,87 \pm 2,36 \times 10^4$ células, no tempo de 24 horas para $41,09 \pm 34,51$ células no sétimo dia e no controle houve aumento de $5,18 \pm 1,83 \times 10^4$ células para $11,08 \pm 6,32 \times 10^4$ células (Figura 13C).

Ao comparar o número de células T CD3⁺CD4⁺ entre os grupos, observou-se que há aumento significativo desta população celular no grupo IL-10^{-/-} em relação ao grupo WT no sétimo dia pós-transplante, foram encontradas $2,28 \pm 1,28 \times 10^3$ células e $0,55 \pm 0,34 \times 10^3$ células, respectivamente (Figura 13D).

No grupo IL-10 deficiente existe uma tendência para o aumento do número de células T CD3⁺CD8⁺ no sétimo dia pós-transplante, no entanto não foi observada diferença significativa em relação ao grupo IL-10 competente. (Figura 13E).

Os dados permitem concluir que há participação significativa de neutrófilos e células T CD3⁺CD4⁺ no processo inflamatório que segue o transplante. A ausência de IL-10 no transplante provoca uma dinâmica de migração diferencial de células inflamatórias no enxerto, sendo observado aumento do número de células no sétimo dia em relação ao controle. É possível que a ausência de IL-10 influencie no controle da resposta inflamatória aumentando a infiltração celular no enxerto, no entanto para que isso seja esclarecido será necessária a realização de experimentos caracterizando a cinética de produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias.

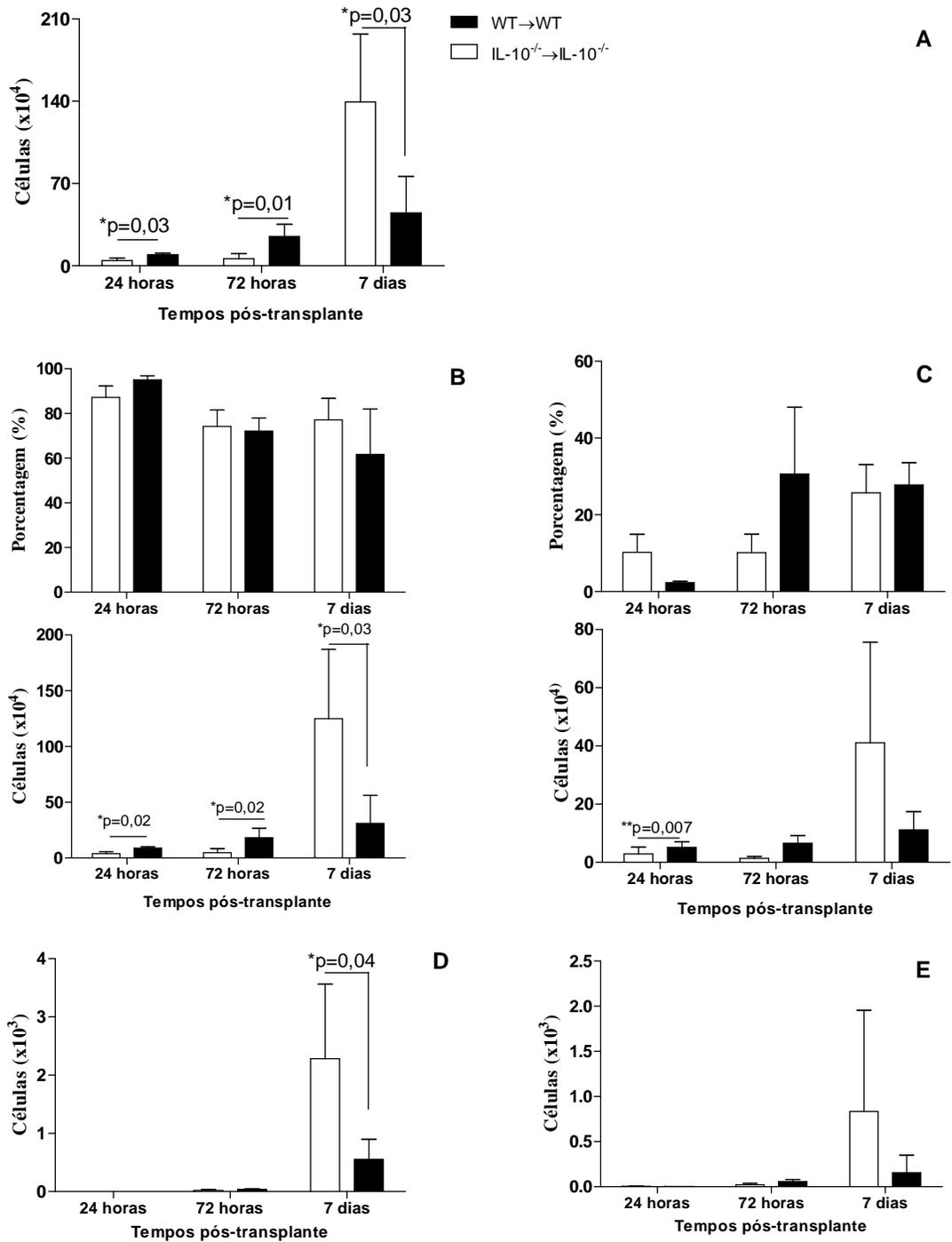


Figura 13- Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplantes singênicos em animais IL10^{-/-} (IL-10^{-/-}→IL-10^{-/-}) □ ou controles (WT→WT) ■. A- Representação do número total de células infiltrantes do enxerto. B- Número total e Porcentagem de células CD11b⁺GR1^{high}. C- Número total e porcentagem de células CD11b⁺GR1^{low}. D- Número total de células CD3⁺CD4⁺. E- Número total de células CD3⁺CD8⁺. Valores expressos em média±desvio padrão, n=4.

4.2.3.3 Caracterização de células inflamatórias no transplante singênico em combinações doador-receptor IL-10^{+/+} → IL-10^{-/-} ou IL-10^{-/-} → IL-10^{+/+}

Em seguida, foi avaliada a frequência e tipo de células inflamatórias no transplante singênico quando o doador apresentava deficiência de IL-10 (IL-10^{-/-} → WT) ou quando o doador era IL-10 competente e o receptor IL-10 deficiente (WT → IL-10^{-/-}). Os enxertos foram removidos 24 horas, 72 horas e 7 dias após o transplante e colocados em cultura por 24 horas. As células que emigraram do enxerto foram identificadas como neutrófilos (CD11b⁺GR-1^{high}), macrófagos (CD11b⁺GR-1^{low}) e células T CD3⁺CD4⁺ ou células T CD3⁺CD8⁺.

Em relação ao número total de células, foi visto que na ausência de IL-10 no doador foi encontrado maior número de células inflamatórias em relação grupo que recebeu enxertos WT em todos os tempos avaliados (Figura 14A).

Em ambos os grupos os neutrófilos representaram a porcentagem majoritária do infiltrado celular, entretanto no ponto de 24 horas a porcentagem de neutrófilos é maior no grupo que recebeu o enxerto WT em relação ao grupo que recebeu o enxerto IL-10^{-/-}. Apesar de, no ponto de 24 horas, ter-se encontrado maior porcentagem de neutrófilos no grupo que recebeu o enxerto WT, em termos de número de células GR1^{high}CD11b⁺ encontrados nos enxertos, o grupo que recebeu o enxerto IL-10^{-/-} apresentou número aumentado de neutrófilos em relação ao grupo que recebeu o enxerto IL-10 competente. Nos pontos de 72 horas e 7 dias o número de neutrófilos também foi maior no grupo que recebeu o enxerto IL-10^{-/-} em relação ao grupo que recebeu o enxerto WT (Figura 14B).

Avaliando a porcentagem de macrófagos presentes nos enxertos não foi visto diferença entre os grupos em nenhum dos tempos pós-transplante, entretanto, analisando o número destas células presentes nos enxertos, verificou-se que existe maior número de macrófagos nos enxertos IL-10^{-/-} em relação aos enxertos WT, no ponto de 24 horas e 72 horas (Figura 14C).

Em seguida, os grupos foram analisados quanto ao número de células T CD3⁺CD4⁺ e células T CD3⁺CD8⁺ infiltrantes nos enxertos. Não foram observadas diferenças significativas no número de células T CD3⁺CD4⁺ entre os grupos, muito embora no sétimo dia pós-transplante ocorra uma tendência de aumento do número destas células nos camundongos que receberam o enxerto IL-10^{-/-} (Figura 14D). Já em relação ao número de células T CD3⁺CD8⁺, foi encontrado aumento do número

destas células no grupo que recebeu o enxerto IL-10^{-/-} em relação ao grupo que recebeu o enxerto WT no sétimo dia pós-transplante (Figura 14E).

Os dados mostram que há maior infiltrado de células inflamatórias nos enxertos quando os doadores são IL-10 deficientes em relação à doadores IL-10 competentes. Isso indica que a produção de IL-10 por células presentes no enxerto pode ser importante para controlar a reação inflamatória local e prevenir o influxo de células inflamatórias no local do transplante.

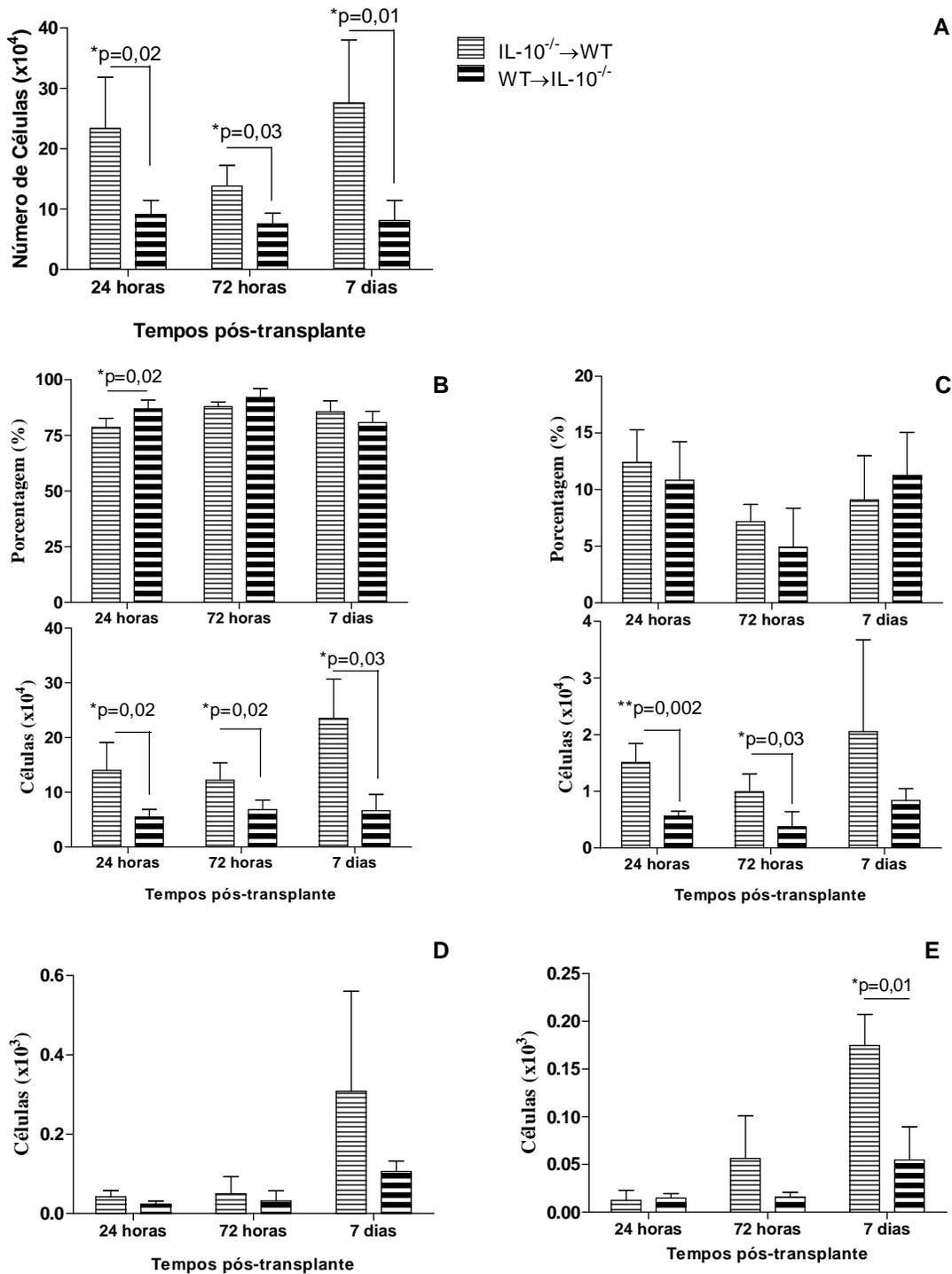


Figura 14- Fenotipagem de células infiltrantes do enxerto após transplantes singênicos de enxertos IL-10^{-/-} em camundongos WT (IL-10^{-/-} → WT) ou de enxertos WT em animais IL10^{-/-} (WT → IL-10^{-/-}). A- Representação do número total de células infiltrantes do enxerto. B- Número total e porcentagem de células CD11b⁺GR1^{high}. C- Número total e porcentagem de células CD11b⁺GR1^{low}. D- Número total de células CD3⁺CD4⁺. E- Número total de células CD3⁺CD8⁺. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=4.

4.3 Avaliação da sobrevida do enxerto alogênico e singênico transplantados em um mesmo receptor

Ao avaliar os dados sobre a cinética de produção de citocinas nos transplantes singênicos e alogênicos, observou-se que ocorre modulação da resposta inflamatória nos tempos iniciais pós-transplante, já sendo encontrada produção de citocinas anti-inflamatórias no enxerto singênico e produção de citocinas pró-inflamatórias no enxerto alogênico, no ponto de 24 horas pós-transplante. Tendo em vista esses dados, questionamos se seria possível modular a resposta inflamatória ao se transplantar a pele singênica juntamente com a pele alogênica. Ou se ao transplantar a pele singênica anteriormente a pele alogênica poder-se-ia criar um ambiente anti-inflamatório com produção de $TGF\beta$ e IL-10 que propiciaria um aumento de sobrevida do enxerto alogênico.

Com tal intento, foram realizados experimentos em que o enxerto singênico foi transplantado simultaneamente com o enxerto alogênico em um mesmo receptor ou se alterou o intervalo de transplante dos dois enxertos: o enxerto singênico foi transplantado 24 horas antes do enxerto alogênico, conforme explicitado na figura 4 em material e métodos.

Os dados mostram que, quando o enxerto singênico foi transplantado simultaneamente ao enxerto alogênico (Alo+Sin), ocorre um aumento na sobrevida do enxerto alogênico em relação aos controles (Alo; $p=0,006$ e Alo+Alo; $p=0,003$). Como controle foi comparada a rejeição entre animais transplantados com um único enxerto alogênico (Izcue et al.) e animais transplantados com dois enxertos alogênicos (Alo+Alo). Isso foi realizado para que se eliminasse a possibilidade de que a disponibilidade de mais de um enxerto acarretasse em aumento de sobrevida do transplante, devido a presença de uma quantidade maior de tecido que as células efetoras teriam que eliminar. Observou-se que o tempo de rejeição entre 1 único enxerto alogênico ou dois enxertos alogênicos foi o mesmo, sugerindo que o fato de se transplantar 1 enxerto ou 2 enxertos não afeta a sobrevida dos mesmos e portanto o prolongamento da sobrevida do enxerto alogênico no transplante simultâneo se deu devido à influência do enxerto singênico e não porque houve um aumento da área de tecido transplantado (Figura 15A).

A sobrevida do enxerto singênico não foi afetada quando houve o transplante simultâneo com a pele alogênica, sendo que as peles singênicas foram aceitas

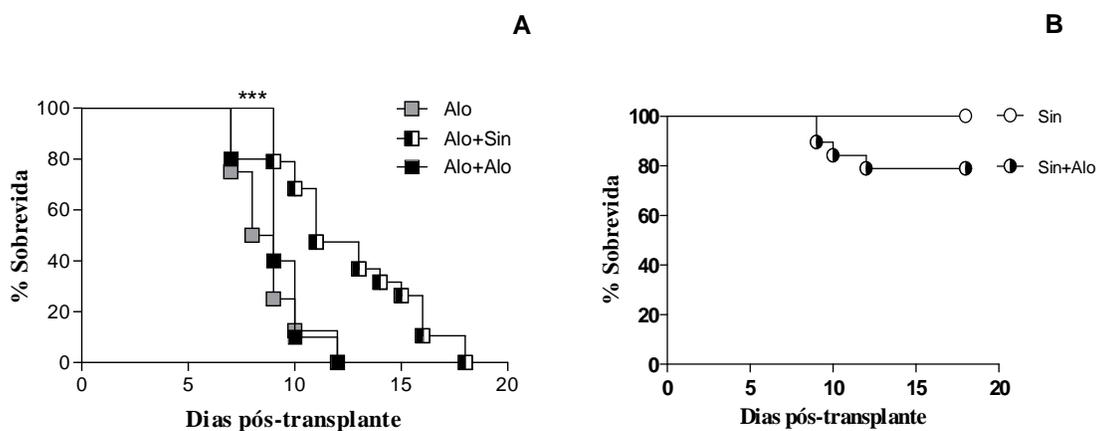
conforme o esperado. Não foram observadas diferenças estatísticas na sobrevida dos enxertos singênicos quando comparados os grupos que receberam transplante simultâneo (sin+Alo) e os que foram transplantados somente com a pele singênica (Sin) (Figura 15B).

Quando o transplante alogênico foi realizado 24 horas após o transplante singênico (Alo24hSin), não foi observado aumento de sobrevida do enxerto alogênico. As peles alogênicas transplantadas 24 horas após o enxerto singênico (Alo24hsin) foram rejeitadas no mesmo período do grupo controle, sendo que o grupo controle consistiu em camundongos transplantados apenas com a pele alogênica (Izcue et al.). Neste mesmo experimento um grupo de camundongos foi transplantado simultaneamente com peles alogênicas e singênicas e nesta situação, como era esperado, a pele alogênica (Alo+Sin) apresentou aumento de sobrevida em relação aos outros grupos (Alo, $p=0,01$ e Alo24hSin; $p=0,01$) (Figura 15C).

A sobrevida do enxerto singênico também foi avaliada e não houve diferença entre a sobrevida dos enxertos singênicos transplantados 24 horas antes dos enxertos alogênicos (Sin24hAlo), dos enxertos singênicos transplantados simultaneamente com os enxertos alogênicos (Sin+Alo) ou de enxertos singênicos transplantados sozinhos em receptores (Sin), todos os enxertos singênicos foram aceitos (Figura 15D).

Concluímos assim que o transplante simultâneo de enxertos alogênicos e singênicos prolonga a sobrevida dos enxertos alogênicos. Provavelmente ocorre uma modulação da resposta imune pelo enxerto singênico que resulta no aumento de sobrevida do enxerto alogênico e que para que ocorra aumento de sobrevida do enxerto alogênico, o transplante singênico deve ser realizado em conjunto com o enxerto alogênico.

Transplante simultâneo



Transplante com intervalo de 24 horas

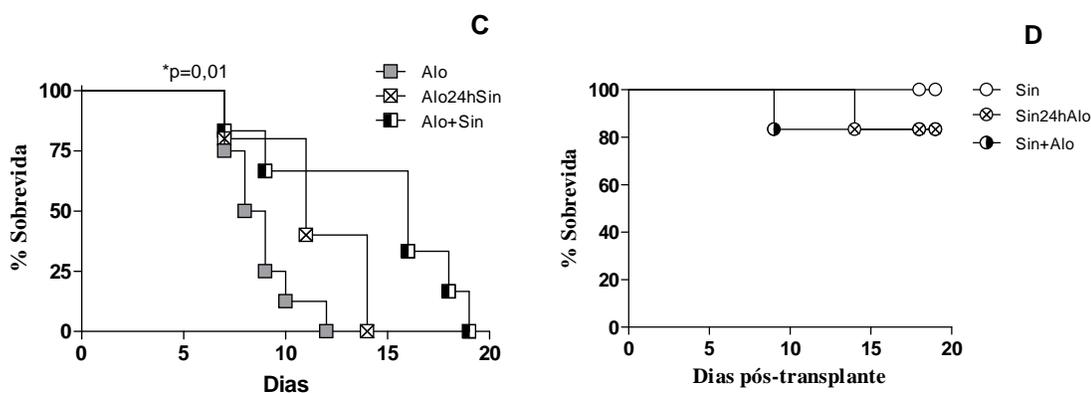


Figura 15- Sobrevida do enxerto de pele em receptores do transplante alógeno (NZW) ■ e/ou singênico (BALB/c) ●. Os camundongos foram transplantados simultaneamente ou não com pele alógena e/ou singênica. A-Sobrevida do enxerto alógeno ■, no transplante simultâneo com o enxerto singênico (Alo+Sin) ▣, no transplante de dois enxertos alógenicos (Alo+Alo) ■ ou no transplante de 1 enxerto alógeno (Alo) ▢. B-Sobrevida de enxertos singênicos ●, no transplante simultâneo com o enxerto alógeno ◐ ou no transplante de 1 enxerto singênico ○; somatórias de animais(n=17). Somatória de 3 experimentos C- Sobrevida dos enxertos alógenicos, quando a pele alógena foi transplantada 24 horas após a singênica (Alo24hSin) ▣, no transplante simultâneo (Alo+Sin) ou no transplante de 1 único enxerto alógeno (Alo) D- Sobrevida de enxertos singênicos, no transplante simultâneo (Sin+Alo), no transplante com intervalo de 24 horas (Sin24hAlo) ⊗ ou no transplante de 1 único enxerto singênico (Sin) (n= 6).

A

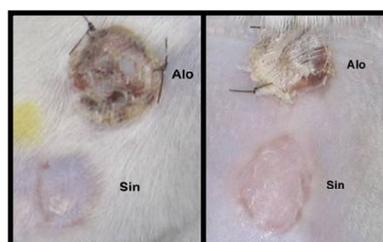
7 dias pós-transplante



9 dias pós-transplante



14 dias pós-transplante

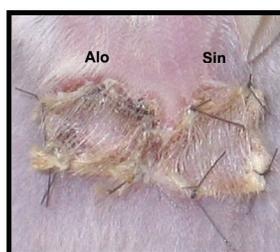


B

7 dias pós-transplante



Transplante com intervalo de 24 horas



Transplante simultâneo



Transplante Alogênico

Figura 16- Aspecto macroscópico do enxerto singênico e alogênico transplantados em um único receptor. A) Aspecto dos enxertos alogênicos e singênicos quando houve transplante simultâneo nos tempos de 7, 9 e 14 dias pós-transplante. B) Aspecto dos enxertos alogênicos e singênicos quando camundongos foram transplantados com pele singênica e 24 horas depois com pele alogênica ou transplantados simultaneamente com enxertos alogênicos e singênicos, no sétimo dia pós-transplante.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar e comparar a resposta inflamatória no transplante de pele alogênica e singênica em camundongos. Procurou-se avaliar alguns eventos da resposta inflamatória no enxerto, por isso analisamos a população celular infiltrada na pele transplantada e as citocinas que eram produzidas por elas ao longo do tempo de transplante.

Analisando-se a cinética do número de células inflamatórias encontradas nos enxertos alogênicos e singênicos transplantados em camundongos BALB/c, observou-se que no período entre 7 horas e 72 horas pós-transplante, o número de células presentes no enxerto alogênico e singênico foi muito similar. Dados esses esperados, uma vez que o dano tecidual provocado pela cirurgia gera resposta inflamatória.

No enxerto alogênico o número de células aumenta progressivamente sendo observado pico de infiltração celular no nono dia pós-transplante. Essa amplificação da resposta inflamatória no transplante alogênico pode ocorrer em virtude da migração de linfócitos T CD4 e T CD8, essas células são ativadas no linfonodo por células apresentadoras de antígenos do doador que migram a esse órgão (Karman et al., 2006; Young et al., 2007), posteriormente a produção de citocinas pró-inflamatórias por estes linfócitos induz o recrutamento de células inflamatórias ao local do transplante (Lovegrove et al., 2001; Richards et al., 2004; Waldmann, 1999).

Em contrapartida, no enxerto singênico ocorreu pico de infiltração celular no ponto de 24 horas e após esse período houve diminuição do número de células até o nono dia. Isso também era esperado, por causa da natureza da combinação doador-receptor em que não há diferenças quanto aos antígenos do MHC e, portanto, ausência de estimulação aloantigênica. Nestas circunstâncias, não é esperado que ocorra diferenciação dos linfócitos T em células efetoras, a não ser que haja quebra da tolerância aos antígenos próprios. Dessa forma, na ausência desse estímulo a resposta imune decorrente da cirurgia diminuiria gradualmente e seria esperado que o transplante fosse aceito. É possível observar um efeito similar após a isquemia e reperfusão de tecidos próprios, após o tecido ser submetido à isquemia por um determinado período, em geral ocorre a elevação de marcadores inflamatórios e aumento de células inflamatórias, estes porém retornam a níveis basais após cerca de 24 horas (Herskowitz et al., 1995; Platz et al., 1998).

Curiosamente, a população majoritária presente em todos os tempos pós-transplante, tanto no transplante singênico quanto alogênico, foi a de neutrófilos. A

porcentagem destes foi sempre acima de 70% da população total, sendo que com 7 horas e 24 horas pós-transplante 95% da população celular era de neutrófilos tanto no enxerto singênico quanto alogênico. Essas observações indicam que os neutrófilos têm participação muito importante no processo de rejeição de enxertos alogênicos, mas também levantam a possibilidade de que essas células tenham um papel no aceite de enxertos singênicos.

No enxerto alogênico foi observado aumento significativo do número de neutrófilos ao longo do tempo pós-transplante. Essa população pode contribuir para a rejeição dos enxertos de diversas maneiras; liberam espécies reativas de oxigênio e substâncias proteolíticas e também produzem quimiocinas que atraem e ativam células apresentadoras de antígenos (Buonocore et al., 2004; Nathan, 2006). Alguns trabalhos mostram que neutrófilos podem realizar a apresentar antígenos à células T por vias alternativas de processamento de antígenos (Nathan, 2006; Potter e Harding, 2001; Reali et al., 1996) e que em determinados pacientes que sofrem de doenças inflamatórias crônicas, neutrófilos humanos podem expressar MHC de classe II e poderiam atuar como APCs (Fanger et al., 1997; Radsak et al., 2000), indicando outro mecanismo pelo qual neutrófilos poderiam contribuir para a rejeição. Outros trabalhos mostraram que existe uma correlação entre a presença de neutrófilos e a rejeição aguda (Hirayama et al., 2006; Surquin et al., 2005), sendo que Morita et al já havia demonstrado em 2001 que a depleção de neutrófilos resulta na sobrevida de enxertos cardíacos alogênicos de 8-10 dias para 21 dias.

No transplante singênico, nos tempos de 7 e 9 dias pós-transplante houve diminuição do número de células inflamatórias, mas a porcentagem de neutrófilos que compunha esse infiltrado celular foi alta. Como a presença de neutrófilos no enxerto singênico não acarretou em destruição tecidual e os enxertos foram aceitos, os dados sugerem que a presença dos neutrófilos nos enxertos singênicos não foi deletéria. É possível que a presença de neutrófilos seja inclusive benéfica para o aceite de enxertos de pele. Existem trabalhos mostrando que os neutrófilos são importantes para a neovascularização tecidual e início do reparo de tecidos que sofreram lesão (Ohki et al., 2005; Toumi et al., 2006).

De modo geral, a presença de células polimorfonucleares é considerada um mau-prognóstico para o aceite de transplantes. No entanto no caso de transplantes de pele, para os quais o processo de neovascularização é importante, os neutrófilos possuem um papel importante para o aceite dos enxertos. Experimentos realizados

em nosso laboratório mostraram que a depleção de neutrófilos não atenuou a rejeição, mas resultou em ausência de neovascularização na pele, provocando a morte dos enxertos por hipoxia (dados não publicados).

Outra população celular que foi avaliada em nosso estudo foram os macrófagos. A presença de macrófagos em órgãos transplantados é bem descrita na literatura, pois esta população celular está sempre presente no enxerto (Hancock et al., 1983). A dinâmica de entrada dessas células é bem estabelecida no caso de transplantes renais (Grimm et al., 1999; Hancock et al., 1983; Wyburn et al., 2005; Wyburn et al., 2005). Nossos estudos com transplante de pele mostraram resultados compatíveis com esses estudos prévios, foi observado aumento contínuo do número de macrófagos até o nono dia pós-transplante nos enxertos alogênicos. No caso do transplante singênico, observou-se infiltração de macrófagos nos tempos iniciais pós-transplante, isto é até 72 horas e após esse ponto o número de macrófagos diminuiu.

Segundo os nossos resultados, podemos inferir que o ponto de 72 horas parece ser um momento importante para o encaminhamento do aceite ou rejeição dos transplantes em nosso modelo. Nesse período observou-se aumento da concentração de citocinas inflamatórias e entrada de linfócitos no enxerto alogênico, enquanto que no enxerto singênico foi observado diminuição do número de células inflamatórias e diminuição de produção de citocinas pró-inflamatórias.

Analisando o conjunto desses dados, é possível que os macrófagos participem do direcionamento da resposta inflamatória nos enxertos. No enxerto alogênico, o aumento dessas células poderia resultar em aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias. Foi mostrado que a lesão decorrente da cirurgia, no caso do transplante, ativa o endotélio e a liberação de substâncias inflamatórias; essas substâncias podem ativar os macrófagos e induzi-los à produzir citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (Morital et al, 2001; Wyburn, 2005). Desta maneira, nos tempos iniciais pós-transplante a ação dos macrófagos pode, de fato, ser danosa ao tecido transplantado. No enxerto singênico, os macrófagos poderiam participar no controle da resposta inflamatória e auxiliar na reparação tecidual, por meio de produção de IL-10, TGF β , enzimas proteolíticas, prostaglandina D2 e fagocitose de células necróticas e em apoptose (Ayala et al., 2003; Hays et al., 2008; Maderna e Godson, 2003).

O duplo comportamento dos macrófagos é bem descrito na literatura. Em 1998, (Erwig et al., 1998) descreveram que essa população de células adquire

características pró ou anti-inflamatórias dependendo do meio em que se encontram; essa modulação é dependente do contato inicial destas células com citocinas presentes no meio.

Outras populações avaliadas em nosso estudo foram as células T CD4⁺ e T CD8⁺. Foram avaliadas a dinâmica e proporção de entrada dessas células nos enxertos. Esse tipo de análise é importante, pois apesar do grande número de estudos procurando-se avaliar ao papel dessas células na rejeição (Bueno e Pestana, 2002; Christianson et al., 1993; Krieger et al., 1996; Youssef et al., 2004), ainda existem dúvidas quanto à contribuição relativa pela qual células T CD4⁺ ou T CD8⁺ seriam responsáveis pela rejeição.

Em relação à presença de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em nosso estudo, nossos resultados mostram grande infiltração destas células nos enxertos alogênicos no sétimo e nono dia pós-transplante em comparação com o transplante singênico. Um fato que deve ser observado é que a quantidade de células T CD4⁺ encontradas no enxerto foi maior em relação às células T CD8⁺. Esses dados sugerem que existe grande participação de células T CD4⁺ na rejeição e que provavelmente existe colaboração de ambas as populações nesse processo (Haskova et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Zhai et al., 2007). Neste caso, as células T CD4⁺ devem contribuir para a rejeição, especialmente devido ao seu papel na produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam células efetoras e ativam células T CD8⁺ citotóxicas. Outra forma pela qual estas células poderiam participar da rejeição seria através da liberação de granzima/perforina, contribuindo para a destruição tecidual do enxerto (Hombach et al., 2001).

Em razão da presença significativa de células polimorfonucleares e macrófagos nos enxertos e sabendo-se que o óxido nítrico é um composto produzido por essas células, avaliou-se a produção de óxido nítrico no enxerto. Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que existe maior produção de óxido nítrico no enxerto alogênico quando comparado ao enxerto singênico. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, pois diversos trabalhos já demonstraram a correlação entre a produção de óxido nítrico e a rejeição de aloenxertos (Holan et al., 2002; Holan et al., 2005; Vos et al., 2000; Winlaw et al., 1995; Worrall et al., 1997). Altas concentrações de óxido nítrico podem auxiliar no processo de rejeição dos enxertos por causar destruição tecidual, esse composto induziria dano tecidual através do aumento a fibrose e necrose de tecidos (Kolb e Kolb-Bachofen, 1998; Pfeilschifter et al., 2001).

Além disso, a indução de iNOS está relacionada ao aumento de efeitos inflamatórios citotóxicos no enxerto, sendo que a inibição dessa enzima resulta em prolongamento da sobrevida do enxerto alogênico (Vos et al., 2000).

Nos enxertos singênicos apesar de ser observada produção de óxido nítrico, essa produção parece não prejudicar o aceite destes enxertos. A produção desse composto foi baixa nos enxertos singênicos e talvez tenha sido insuficiente para induzir dano ou algum estímulo pró-inflamatório. Entretanto, é importante lembrar que os efeitos desse composto no sistema imune são muito variáveis e podem atuar de acordo com a sua concentração ou tempo de exposição sobre as células (Kolb e Kolb-Bachofen, 1998; Tripathi et al., 2007), portanto não se pode descartar a possibilidade de que no transplante singênico o óxido nítrico possa atuar de forma positiva para o aceite. Alguns dados corroboram com essa hipótese, como seu efeito regulador sobre a inflamação; ele é capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão no endotélio, como por exemplo, de selectinas e com isso diminuir a entrada de células inflamatórias no enxerto; também pode diminuir a proliferação de linfócitos T e B; e inibir a produção de anticorpos (Bogdan, 2001); em transplantes já foi descrito que a liberação contínua de óxido nítrico pode prevenir a hiperplasia intimal e formação de trombose na superfície do endotélio (Lee et al., 1999).

Conforme citado anteriormente, observou-se que neutrófilos representaram a parcela majoritária das células inflamatórias nos enxertos. Em razão de pesquisas que demonstraram a existência de uma população de células, denominada Th17, capaz de secretar IL-17 e induzir o recrutamento de neutrófilos (Bettelli et al., 2006; Harrington et al., 2006), foi investigada a produção de citocinas relacionadas as células Th17.

Em 2006, (Veldhoen et al., 2006) mostraram que as citocinas IL-6 e TGF β eram responsáveis pela geração das células Th17. Portanto, decidimos investigar a produção destas citocinas nos enxertos singênicos e alogênicos.

Em relação à IL-6, observamos maior produção de IL-6 no transplante alogênico entre 24 horas e 7 dias, sendo que no ponto de 7 horas pós-transplante já foi possível observar maior tendência de produção de IL-6 em relação ao transplante singênico. Além disso, a produção desta citocina parece ser maior nos tempos iniciais pós-transplante, isto é até 72 horas. A participação de IL-6 na rejeição de enxertos alogênicos já foi descrita anteriormente (Jerin et al., 2003; Liang et al., 2007; Min et al., 2001), assim como foi observado em nosso estudo, no trabalho de Liang et al

também detectou-se produção de IL-6 em períodos muito iniciais pós-transplante, a IL-6 foi detectada no soro de animais que receberam transplantes cardíacos alogênicos no ponto de 6 horas pós-transplante.

Um fato intrigante mostrado no trabalho de Liang et al é que para o processo de rejeição a produção de IL-6 parece mais importante no doador e não no receptor; seu grupo demonstrou que o transplante de enxertos alogênicos de animais IL-6^{-/-} resulta em aumento de sobrevida, mas peles alogênicas transplantadas em receptores IL-6^{-/-} não apresentam aumento de sobrevida. Um possível mecanismo de rejeição por meio da IL-6 seria através da supressão de células T reguladoras (Treg) permitindo maior ativação de células T (Pasare e Medzhitov, 2003).

Outra citocina avaliada em nosso estudo foi o TGF β , pois, como dito anteriormente, essa citocina em conjunto com a IL-6 é uma importante indutora de células Th17, promovendo também a expressão do receptor de IL-23 nestas células (Mangan et al., 2006). No entanto, é importante lembrar que o TGF β é uma citocina primariamente descrita como uma potente imunossupressora, pois além de suprimir diferenciação de células Th1 e Th2, também é um indutor de células Treg FOXP3⁺ (Fantini et al., 2004). Sendo assim, torna-se evidente que o TGF β possui um papel duplo no direcionamento da resposta imune dependendo das citocinas às quais se associa, podendo encaminhar a resposta dos linfócitos para um perfil inflamatório ou para um perfil supressor.

Comparando-se a produção dessa citocina nos enxertos singênicos e alogênicos, foi observado que houve alta produção de TGF β em praticamente todos os tempos pós-transplante tanto no transplante alogênico quanto singênico. Nos enxertos alogênicos ocorreu produção de TGF β concomitantes com produção de IL-6, indicando que nesse contexto seria possível a geração de células Th17. De fato foi observada produção alta produção de IL-17 nestes enxertos a partir de 72 horas, indicando uma alta probabilidade de que realmente haja participação de células Th17 na rejeição dos enxertos alogênicos.

Em contrapartida, no transplante singênico, no qual também ocorreu alta produção de TGF β e a produção de IL-6 foi muito baixa, praticamente não houve produção de IL-17. O único ponto em que foi observada IL-17 no transplante singênico foi no de 9 dias, é possível que essa produção de IL-17 seja decorrente do aumento do número de células T CD4⁺ no sétimo dia pós-transplante. Existem alguns

trabalhos indicando que células Th2 também podem produzir IL-17 e nesse caso a IL-17 possuiria atividade imunossupressora (Owyang et al., 2006; Starnes et al., 2002).

Talvez ainda mais importante que o seu papel na geração de células Th17, o papel local do TGF β no enxerto atuando na cicatrização e fibrose seja de fundamental importância para o aceite ou rejeição do enxerto. Existe uma correlação, já bem estabelecida entre a produção excessiva de TGF β , por macrófagos em locais de dano, e uma maior deposição de colágeno e fibrose (Hays et al., 2008; Verrecchia e Mauviel, 2007; Wyburn et al., 2005). TGF β é uma citocina reguladora chave na remodelagem e construção da matriz extracelular e por isso o seu papel na cicatrização tem sido ostensivamente estudado.

Outra citocina relacionada às células Th17 que foi estudada foi a IL-23, uma vez que tem sido demonstrado que a IL-23 é importante para amplificação e sobrevivência de células Th17 (Bettelli et al., 2006; Veldhoen e Stockinger, 2006). Além disso, a relevância da IL-23 nos processos inflamatórios não é restrita somente à manutenção das células Th17 tem sido ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos em doenças inflamatórias (Cua et al., 2003).

Em nosso estudo foi comparada a produção de IL-23 entre transplantes singênicos e alogênicos. Como indicado nos resultados foi visto que há maior produção de IL-23 nos transplantes alogênicos até 72 horas pós-transplante, enquanto no transplante singênico ocorreu pequena produção de IL-23 apenas no ponto de 24 horas. A produção de IL-23 nos enxertos alogênicos pode ser responsável pelo aumento do número de macrófagos, observado a partir de 72 horas (Figura 5F). Conforme visto nos trabalhos de Cua et al (2002) e (Wiekowski et al., 2001) parece haver uma correlação entre a produção de IL-23 e o aumento de macrófagos no sítio de inflamação.

Em 2001, Lira et al mostraram que a expressão ubíqua ou em múltiplos tecidos de um epítipo da IL-23, quando elevada em camundongos, resultou em fenótipos de inflamação sistêmica, falha de crescimento, infertilidade, morte acelerada e maior índice de camundongos natimortos. Além disso, os animais eram anêmicos e tinham números aumentados de neutrófilos no sangue, no soro destes animais havia níveis elevados de IL-1 e TNF. No mesmo trabalho, foi observado que nestes animais vários tecidos apresentavam grande infiltração de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, a pele possuía infiltração de neutrófilos e macrófagos na derme e epiderme, além de acantose (espessamento da epiderme), acompanhada de ulceração e necrose. As

características da pele com expressão elevada de IL-23 foram muito semelhantes às das peles IL-10^{-/-} aceitas no transplante singênico (Figuras 8 e 9).

Conforme mencionado anteriormente houve maior produção de IL-17 nos enxertos alogênicos quando comparado aos enxertos singênicos. Além disso, também foi observado produção de IL-22 nos enxertos alogênicos enquanto no enxerto singênico não houve detecção dessa citocina. Tanto IL-22 quanto IL-17 foram produzidas em maior quantidade no sétimo e nono dia pós-transplante, quando é observado maior infiltração de linfócitos nos enxertos alogênicos.

O papel efetor da IL-22 ainda não está claro, mas parece ser importante em doenças inflamatórias da pele, como a psoríase, que se trata de uma doença crônica inflamatória que tem como característica a infiltração de leucócitos na derme e epiderme e hiperplasia da epiderme (acantose). Em 2007, Zheng et al descreveram que a produção de IL-22 em orelhas de camundongos provocava acantose e grande infiltração celular, enquanto que o bloqueio de IL-22 resultava em diminuição da infiltração de macrófagos e neutrófilos, mas especialmente de neutrófilos. Baseado nesses dados e nos resultados obtidos em nosso laboratório pode-se sugerir que no caso do transplante de pele, a IL-22 parece ter um papel bastante importante para a rejeição de enxertos alogênicos, contribuindo para o aumento de infiltração de células polimorfonucleares.

A produção de IL-22 e IL-17 em conjunto com a expressão de IL-6, TGF β e IL-23 nos transplantes alogênicos é um forte indício de que há participação de células Th17 no processo de rejeição da pele. A relação entre produção de IL-22 e IL-23 e a indução de processos inflamatórios na pele é um dado muito interessante, uma vez que induziu fenótipos semelhantes à psoríase na pele de camundongos (Wiekowski et al., 2001; Zheng et al., 2007) e esse fenótipo foi muito similar ao encontrado nos transplantes singênicos na ausência total de IL-10 ou na ausência de IL-10 no doador (IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-} ou IL-10^{-/-} → WT). Possivelmente a ausência da IL-10 provoca uma falha na regulação do processo inflamatório na pele; nessa situação macrófagos ativados produziram TGF β e se houvesse produção de IL-6 poderia ocorrer indução de células Th17. A produção de IL-22 e IL-17 pelas células Th17 provocaria os fenótipos observados nesses transplantes: acantose e infiltração de células inflamatórias.

Com relação à produção de IFN γ , nossos experimentos mostram que a produção dessa citocina foi sempre maior no enxerto alogênico em relação ao enxerto

singênico. Já no ponto de 7 horas foi possível observar produção de IFN γ no enxerto alogênico, enquanto que no enxerto singênico essa citocina não foi detectada. Essa produção precoce de IFN γ sugere que células T de memória poderiam estar participando do início do processo de rejeição. A participação de células T de memória produtoras de IFN γ já foi descrita na literatura como um fator que favorece a rejeição dos enxertos (El-Sawy et al., 2004; Heeger et al., 1999).

Foi interessante observar que nos tempos de 7 dias e 9 dias pós-transplante, houve alta produção de IFN γ ao mesmo tempo em que também houve alta produção de IL-17. Poder-se-ia esperar que a produção de IFN γ diminuísse a produção de IL-17, uma vez que, em 2005 o grupo de Weaver et al e o grupo de Yang et al, publicaram trabalhos nos quais foi mostrado que IFN γ suprimia a diferenciação de células T *naïve* em Th17.

Possivelmente não foi observado diminuição na produção de IL-17 quando ocorreu aumento de IFN γ nos enxertos alogênicos, uma vez que a produção dessas citocinas não foi medida no linfonodo (local onde ocorre a diferenciação de linfócitos T *naïve* para os perfis Th1 ou Th17), mas sim pelas células presentes nos enxertos. Teoricamente, a maior parte das células encontradas no enxerto já foram diferenciadas e exercem um papel efetor, portanto mesmo que ocorresse aumento da produção de IFN γ no enxerto, essa produção poderia não afetar a produção de IL-17 pelas células Th17. Outra possibilidade seria a presença de células Th17 duplo positivas para IFN γ e IL-17 no enxerto. Essas células já foram descritas em células humanas (Chen et al., 2007; Wilson et al., 2007).

No transplante singênico também foi observada produção de IFN γ no nono dia pós-transplante, embora em pequena quantidade. É importante lembrar que IFN γ além de induzir a resposta citotóxica de células T CD8⁺ também possui um papel regulador. No caso do transplante singênico, a produção de IFN γ poderia ser importante para regular a resposta inflamatória e não atuaria necessariamente como uma citocina pró-inflamatória. Existem trabalhos mostrando que a produção de IFN γ protege contra a necrose de enxertos (Halloran et al., 2001) e é um importante regulador da homeostase de células T CD4 e CD8, induzindo apoptose nessas células (Seder e Ahmed, 2003; Yang et al., 2005).

Outra citocina que possui uma importante função reguladora da resposta imune é a IL-10. No caso de transplantes, há resultados contraditórios à respeito da terapia

empregando-se IL-10 na tentativa de prolongar a sobrevida de enxertos alogênicos em modelos de transplantes em animais.

Esses dados controversos relativos ao tratamento de enxertos alogênicos com IL-10 ainda não são bem compreendidos, mas altas quantidades de IL-10 parecem ser deletérias enquanto que baixas quantidades de IL-10 parecem ser benéficas para a sobrevida do enxerto alogênico (Moore et al., 2001). Esta última observação feita no trabalho de Moore et al (2001) parece bastante pertinente em relação aos dados obtidos em nosso trabalho, onde foi observada produção de IL-10 em todos os tempos pós-transplante do enxerto singênico, embora não em níveis muito elevados.

Em nossos estudos, o pico de produção de IL-10 no enxerto singênico foi em 24 horas, e os níveis dessa citocina foram menores em relação aos dos enxertos alogênicos cujo pico ocorreu em 72 horas. Esses dados indicam que pequenas variações de IL-10 assim como o momento em que a mesma é produzida poderiam influenciar na resposta ao transplante, favorecendo ou prejudicando o aceite do enxerto. Essa última idéia foi reforçada pelos experimentos onde se observou aumento da sobrevida do enxerto alogênico no modelo em que a pele singênica foi transplantada ao mesmo tempo em que a pele alogênica; esse efeito se perdeu quando houve intervalo de 24 horas entre o transplante da pele singênica e da pele alogênica.

Para melhor investigar o papel da IL-10 no aceite de transplantes, foram realizados transplantes alogênicos e singênicos na ausência ou presença de IL-10. Os experimentos mostraram que não somente a produção de IL-10 é essencial para o aceite de enxertos singênicos, mas também que a IL-10 produzida pelas células presentes no enxerto parece ser fundamental para o aceite do transplante. Como pode ser visto na figura 9B e C, quando a pele do doador IL-10 competente é transplantada em camundongos IL-10^{-/-} observa-se que o aceite do enxerto ocorre de forma muito similar ao ocorrido em combinações doador-receptor providos de IL-10. Por outro lado, a presença de IL-10 no receptor não foi suficiente para favorecer o enxerto de pele de camundongos IL-10^{-/-}. O fato de que a porcentagem de aceite de enxertos providos de IL-10 seja significativamente maior em relação aos enxertos provenientes de animais IL-10^{-/-}, mesmo que estes sejam transplantados em animais IL-10 competentes, apontam que a produção local de IL-10 é extremamente importante para esse processo. Na literatura há evidências de que nem sempre o tratamento dos enxertos com IL-10 resulta em melhora da sobrevida (Kuttler et al.,

2007; Li et al., 1999; Qian et al., 1996; Zheng et al., 1995) e nota-se que, dentre essas tentativas, tratamentos que utilizam a administração sistêmica de IL-10 são menos bem sucedidos (Qian et al., 1996; Furukawa et al., 1999). Baseando-se em nossos resultados podemos inferir que a regulação mediada por IL-10 é complexa. Portanto para que se obtenham resultados positivos ao utilizar essa citocina no tratamento de transplantes, é necessário que se compreenda melhor em que momento a IL-10 deve ser introduzida no tratamento, quais as concentrações apropriadas que devem ser utilizadas e a duração do tratamento.

Com o intuito de investigar se a ausência de IL-10 poderia acarretar um aumento da resposta inflamatória nos enxertos, caracterizamos as células infiltrantes nos enxertos singênicos e alogênicos na ausência de IL-10 nos pontos de 24 horas, 72 horas e 7 dias pós-transplante. No caso dos enxertos alogênicos, ao contrário do esperado, não foram observadas diferenças significativas em relação ao número de células inflamatórias entre os receptores IL-10^{-/-} ou WT em nenhum dos pontos avaliados. Esperávamos encontrar maior quantidade de células inflamatórias nos camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-} em comparação com os camundongos C57Bl6/IL-10^{+/+}, uma vez que os receptores IL-10 deficientes apresentaram rejeição acelerada do aloenxerto. Esses dados sugerem que a rejeição acelerada dos aloenxertos na ausência de IL-10 não seja decorrente de um aumento do número de células inflamatórias no enxerto. Pode-se ainda considerar que, apesar da semelhança quanto ao número de células entre os grupos, as células inflamatórias encontradas nos camundongos C57Bl6/IL-10^{-/-} estariam mais ativadas e produzindo maior quantidade de fatores pró-inflamatórios prejudicando a aceitação do enxerto.

Quanto aos transplantes singênicos realizados na ausência ou presença de IL-10, foi visto que existe aumento do número de células inflamatórias nos enxertos IL-10^{-/-} (IL-10^{-/-}→WT ou WT→ IL-10^{-/-}), conforme observado nas figuras 13 e 14. Esse aumento é mais evidente no sétimo dia pós-transplante, quando são encontrados maior número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

Existem trabalhos mostrando que em doenças autoimunes a porcentagem de células T antígeno-específicas presentes no sítio inflamatório é muito pequena (Xiao e Link, 1999) e alguns estudos sugerem que essa pequena parcela de células T antígeno-específicas poderia regular células não-específicas direcionando-as para um perfil pró-inflamatório (Brocke et al., 1996; Steinman, 1996). No caso do número aumentado linfócitos T encontrados nos enxertos singênicos na ausência de IL-10,

seria improvável de que se tratassem de linfócitos T antígeno-específicos ativados, pois teoricamente os epítomos expressos nestes tecidos são próprios e dessa forma, não seria esperado que estas células T mediassem destruição do enxerto a não ser que houvesse alguma falha na tolerância aos antígenos próprios ou se fosse possível que estas células fossem ativadas devido à grande concentração de fatores inflamatórios no local. É mais provável que o fato de se encontrar número aumentado de linfócitos T seja decorrente do aumento do número de macrófagos e neutrófilos, essas populações celulares poderiam secretar citocinas inflamatórias e quimiocinas e conseqüentemente causar o recrutamento de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Buonocore et al., 2004). Esses dados sugerem que a produção de IL-10 pelas células presentes no tecido doado deve ser importante para controlar a reação inflamatória local e restringir o influxo de células no enxerto. No entanto, permanece a questão se estes linfócitos participam da destruição tecidual do enxerto.

Esses últimos dados somados aos resultados anteriores que mostram maior produção de IL-10 nos enxertos singênicos em relação aos enxertos alogênicos no ponto de 24 horas sugerem que células do próprio enxerto, mediante o estímulo inflamatório no local do transplante, produziram IL-10 para regular a resposta inflamatória local. Essas células poderiam ser ativadas mediante o processo inflamatório desencadeado pelo dano da cirurgia e na ausência de estímulos de alo-antígenos, produziram IL-10. Condizente com essa hipótese Clark et al (2007) descreveram a presença de Treg na pele, que são ativadas mediante processos inflamatórios e produção de IL-15 (Clark e Kupper, 2007). Portanto, é possível que a população celular envolvida nesse processo inclua a de células Treg do doador, produtoras de IL-10. Além disso, existem outras importantes fontes de produção de IL-10 na pele dentre elas as próprias células epiteliais, as células endoteliais, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos (de Waal Malefyt et al., 1991) e também queratinócitos, sendo que este último grupo celular compõe uma parcela significativa das células presentes na epiderme e também podem ser uma importante fonte de IL-10 (Enk et al., 1993).

Pela análise histológica, a pele singênica IL-10^{-/-} transplantada apresenta um aspecto muito semelhante às peles de indivíduos que sofrem de psoríase. À luz das informações de que grandes quantidades de IL-22 e IL-23 podem induzir um fenótipo de psoríase em peles sadias além do fato de que a IL-22 é uma citocina efetora de células Th17 e capaz de estimular a proliferação de queratinócitos (Ma et al., 2008) e

que o bloqueio de IL-10 resulta em aumento de IL-17 na mucosa intestinal (Jarry et al., 2008), é bem provável que células Th17 estejam participando da destruição tecidual observada no transplante singênico IL-10^{-/-}.

Uma hipótese é de que a IL-10 provavelmente iniba a ação das células Th17 e conseqüentemente deve inibir a produção de IL-22 por estas células. Para investigar se a ausência de IL-10 provoca um aumento de citocinas relacionadas às células Th17, seria interessante avaliar a produção de IL-6, TGF β , IL-23, IL-17, IL-22 nos transplantes com peles de camundongos IL-10^{-/-}.

Outra possibilidade é a de que a produção de TGF β influencie o aspecto de fibrose observado nos enxertos singênicos na ausência de IL-10 no doador (IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-} e IL-10^{-/-} → WT), uma vez que foi observada maior quantidade de macrófagos no sétimo dia dos transplantes IL-10^{-/-} → IL-10^{-/-} em relação ao controle WT → WT. O aumento de macrófagos poderia indicar maior produção de TGF β nestes enxertos. Se em excesso, o TGF β é capaz induzir uma produção exacerbada de colágeno e inibidores de proteases provocando o rearranjo anormal da matriz extracelular e contribuindo para a formação de cicatrizes ao invés de um tecido de reparo sem danos (Hays et al., 2008; Verrecchia e Mauviel, 2007; Wyburn et al., 2005). Para confirmar essa hipótese será necessário dosar a produção dessa citocina nos enxertos.

A participação da IL-10 na modulação da resposta ao enxerto alogênico também pode ser sugerida no modelo de transplante simultâneo. Embora não tenhamos avaliado a sobrevida do enxerto alogênico na ausência da IL-10, nesse modelo, a observação de que houve aumento de sobrevida da pele alogênica quando transplantada ao mesmo tempo em que se realizou o transplante singênico, sugere que a IL-10 produzida precocemente no enxerto singênico foi capaz de suprimir a resposta imune aos antígenos alogênicos. É possível que o período entre 7 horas e 24 horas onde se observa, em experimentos anteriores, aumento da produção de IL-10 no enxerto singênico, quando comparado ao alogênico, seja crucial para que se tenha modulação da resposta imune aos aloantígenos. Essa hipótese se apóia também na observação de que quando a pele alogênica foi transplantada 24 horas após a singênica, a sobrevida não foi prolongada em relação ao controle alogênico.

Em 2006 Fucs et al mostraram que era possível induzir tolerância a enxertos alogênicos através do aumento da frequência de células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras; além disso a indução dessas células era dependente do reconhecimento cruzado de

epítomos próprios e alogênicos em células apresentadoras de antígeno (APC). Portanto, é possível que o aumento da sobrevida do enxerto alogênico transplantado simultaneamente com o enxerto singênico ocorra devido à geração de Tregs, sendo que para a indução dessa população celular seja necessário que ocorra a apresentação de antígenos próprios e alogênicos por uma mesma APC.

Além disso, especula-se que a produção de IL-10 pelo transplante singênico nas primeiras 24 horas pós-transplante seja importante para regular a apresentação de antígenos pelas APCs e contribuir para geração de Tregs. De maneira que quando houve intervalo de 24 horas entre os transplantes singênico e alogênico, não ocorreu aumento da sobrevida do enxerto alogênico. Para melhor elucidar essa hipótese, poder-se-ia avaliar a população de células Treg quando o transplante simultâneo de enxertos singênicos e alogênicos fosse realizado; assim seria possível verificar se há aumento de Tregs nesta situação.

Resumindo, os resultados obtidos na caracterização de cinética de células inflamatórias nos transplantes alogênicos e singênicos, mostram que em 7 horas já ocorre produção diferencial de citocinas pró e anti-inflamatórias entre o enxerto alogênico e o enxerto singênico. Isso indica que há um direcionamento precoce da resposta imune para a rejeição ou aceite, logo nos tempos iniciais pós-transplante. Conseqüentemente, é possível que ocorra discriminação de próprio e não próprio logo após o transplante pois já existe um direcionamento da resposta imune no ponto de 7 horas pós-transplante.

O direcionamento da resposta imune pode ser decorrente do reconhecimento dos antígenos próprios e não próprios por células T. Provavelmente as células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos próprios no enxerto singênico são células Treg, já presentes no tecido que mediante o estímulo inflamatório são ativadas e produzem IL-10. No enxerto alogênico pode ocorrer reconhecimento do alo-antígeno por células T de memória que estimulam a resposta inflamatória através da produção de IFN γ .

Além disso, os experimentos com camundongos IL-10 deficientes apontam que a produção local de IL-10 nos enxertos é de extrema importância no processo de aceite de enxertos, provavelmente regulando a entrada e atividade de células inflamatórias no local do transplante.

6 CONCLUSÕES

1. O infiltrado celular no transplante alogênico aumenta progressivamente enquanto que no enxerto singênico há progressiva diminuição das células inflamatórias. Em 24 horas pós-transplante já é possível verificar tendência a um perfil pró-inflamatório em resposta ao enxerto alogênico e anti-inflamatório no enxerto singênico.
2. A produção de IL-10 é fundamental para o aceite de enxertos singênicos, sendo que a produção dessa citocina pelas células presentes no tecido do doador parece ser crucial nesse processo.
3. A IL-10 produzida no enxerto parece ser importante na regulação da resposta inflamatória, diminuindo a entrada de células inflamatórias no local do transplante. Em transplantes singênicos a ausência total de IL-10 ou a ausência de IL-10 no doador acarreta em aumento do número de células inflamatórias no enxerto e é observada destruição e maior fibrose do tecido transplantado.
4. A resposta imune contra enxertos alogênicos parece ser modulada de através de uma regulação exercida pelo transplante de pele singênica, além disso, essa modulação aparente ser possível somente em um intervalo inferior à 24 horas pós-transplante. Observamos que o transplante simultâneo de enxertos alogênicos e singênicos acarreta em maior sobrevida do enxerto alogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMB. Transplantes de órgãos no Brasil. Revista da Associação Médica Brasileira. 2003;49(1):1.

Ando T, Langley RR, Wang Y, Jordan PA, Minagar A, Alexander JS, et al. Inflammatory cytokines induce MAdCAM-1 in murine hepatic endothelial cells and mediate alpha-4 beta-7 integrin dependent lymphocyte endothelial adhesion in vitro. BMC physiology. 2007;7:10.

Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. American Journal of Transplantation. 2005;5(5):969-75.

Andrews DM, Smyth MJ. Stress gets under your skin. Nature immunology. 2008;9(2):119-20.

Antonyshy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. Journal of immunology. 1999;162(1):577-84.

Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY. Mechanisms of immune resolution. Critical care medicine. 2003;31(8 Suppl):S558-71.

Barclay AN, Mason DW. Induction of Ia antigen in rat epidermal cells and gut epithelium by immunological stimuli. The Journal of experimental medicine. 1982;156(6):1665-76.

Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, et al. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. The Journal of experimental medicine. 1991;174(6):1461-6.

Betelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441(7090):235-8.

Bishop DK, Chan Wood S, Eichwald EJ, Orosz CG. Immunobiology of allograft rejection in the absence of IFN-gamma: CD8+ effector cells develop independently of CD4+ cells and CD40-CD40 ligand interactions. Journal of immunology. 2001;166(5):3248-55.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2001;2(10):907-16.

Bradley JA, Sarawar SR, Porteous C, Wood PJ, Card S, Ager A, et al. Allograft rejection in CD4+ T cell-reconstituted athymic nude rats--the nonessential role of host-derived CD8+ cells. *Transplantation*. 1992;53(2):477-82.

Brocke S, Gijbels K, Allegretta M, Ferber I, Piercy C, Blankenstein T, et al. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature*. 1996;379(6563):343-6.

Brook MO, Wood KJ, Jones ND. The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation*. 2006;82(1):1-9.

Bueno V, Pestana JO. The role of CD8+ T cells during allograft rejection. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2002;35(11):1247-58.

Buonocore S, Surquin M, Le Moine A, Abramowicz D, Flamand V, Goldman M. Amplification of T-cell responses by neutrophils: relevance to allograft immunity. *Immunology letters*. 2004;94(3):163-6.

Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(9):2936-46.

Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. 1993;42(1):44-55.

Clark RA, Kupper TS. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood*. 2007;109(1):194-202.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.

Davis WC, McKenzie IF, Melvold RW. A comparison of skin and heart graft rejection patterns in H-2 mutant mice. *Transplantation*. 1980;29(3):189-92.

de Oliveira SI, Fernandes PD, Amarante Mendes JG, Jancar S. Phagocytosis of apoptotic and necrotic thymocytes is inhibited by PAF-receptor antagonists and affects LPS-induced COX-2 expression in murine macrophages. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2006;80(1-2):62-73.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(5):1209-20.

Deschamps JY, Roux FA, Sai P, Gouin E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2005;12(2):91-109.

Dubernard JM, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Badet L, Moure C, et al. Outcomes 18 months after the first human partial face transplantation. *The New England journal of medicine*. 2007;357(24):2451-60.

el-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Current opinion in immunology*. 2002;14(5):562-8.

El-Sawy T, Miura M, Fairchild R. Early T cell response to allografts occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *The American journal of pathology*. 2004;165(1):147-57.

Eming SA, Werner S, Bugnon P, Wickenhauser C, Siewe L, Utermohlen O, et al. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. *The American journal of pathology*. 2007;170(1):188-202.

Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *Journal of immunology*. 1993;151(5):2390-8.

Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *Journal of immunology*. 1998;161(4):1983-8.

Fabrega AJ, Fasbender AJ, Struble S, Zabner J. Cationic lipid-mediated transfer of the hIL-10 gene prolongs survival of allogeneic hepatocytes in Nagase analbuminemic rats. *Transplantation*. 1996;62(12):1866-71.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):890-8.

Fadok VA, Chimini G. The phagocytosis of apoptotic cells. *Seminars in immunology*. 2001;13(6):365-72.

Fanger NA, Liu C, Guyre PM, Wardwell K, O'Neil J, Guo TL, et al. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*. 1997;89(11):4128-35.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of immunology*. 2004;172(9):5149-53.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170(6):2081-95.

Fischbein MP, Yun J, Laks H, Irie Y, Oslund-Pinderski L, Fishbein MC, et al. Regulated interleukin-10 expression prevents chronic rejection of transplanted hearts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2003;126(1):216-23.

Furukawa Y, Becker G, Stinn JL, Shimizu K, Libby P, Mitchell RN. Interleukin-10 (IL-10) augments allograft arterial disease: paradoxical effects of IL-10 in vivo. *The American journal of pathology*. 1999;155(6):1929-39.

Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *Journal of anatomy*. 1943;77(Pt 4):299-310 4.

Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999;10(7):1582-9.

Halloran PF, Miller LW, Urmson J, Ramassar V, Zhu LF, Kneteman NM, et al. IFN-gamma alters the pathology of graft rejection: protection from early necrosis. *Journal of immunology*. 2001;166(12):7072-81.

Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation*. 1983;35(5):458-63.

Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current opinion in immunology*. 2006;18(3):349-56.

Haskova Z, Usiu N, Pepose JS, Ferguson TA, Stuart PM. CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. *Transplantation*. 2000;69(4):483-7.

Hays PL, Kawamura S, Deng XH, Dagher E, Mithoefer K, Ying L, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel. *The Journal of bone and joint surgery*. 2008;90(3):565-79.

He C, Schenk S, Zhang Q, Valujskikh A, Bayer J, Fairchild RL, et al. Effects of T cell frequency and graft size on transplant outcome in mice. *Journal of immunology*. 2004;172(1):240-7.

Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, Dejelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *Journal of immunology*. 1999;163(4):2267-75.

Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *The American journal of pathology*. 1995;146(2):419-28.

Hildemann WH, Morgan M, Frautnick L. Immunogenetic components of weaker histoincompatibility systems in mice. *Transplantation proceedings*. 1970;2(1):24-31.

Hirayama S, Shiraishi T, Shirakusa T, Higuchi T, Miller EJ. Prevention of neutrophil migration ameliorates rat lung allograft rejection. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2006;12(9-10):208-13.

Holan V, Krulova M, Zajicova A, Pindjakova J. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. *Molecular immunology*. 2002;38(12-13):989-95.

Holan V, Pindjakova J, Zajicova A, Krulova M, Zelezna B, Matousek P, et al. The activity of inducible nitric oxide synthase in rejected skin xenografts is selectively inhibited by a factor produced by grafted cells. *Xenotransplantation*. 2005;12(3):227-34.

Hombach A, Heuser C, Marquardt T, Wieczarkowicz A, Groneck V, Pohl C, et al. CD4+ T cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a MHC antigen- and Fas-independent fashion. *Journal of immunology*. 2001;167(2):1090-6.

Horner BM, Randolph MA, Huang CA, Butler PE. Skin tolerance: in search of the Holy Grail. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008;21(2):101-12.

Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008;28(4):559-70.

Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(3):1132-42.

JAX. Il10tm1Cgn, Version 1. 2008 11 Jun 2008 [cited 2008 13 Jun 2008]; Available from: http://jaxmice.jax.org/pub-cgi/protocols/protocols.sh?obitype=protocol&protocol_id=346

Jerin A, Pozar-Lukanovic N, Sojar V, Stanisavljevic D, Paver-Erzen V, Osredkar J. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in liver surgery. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2003;41(7):899-903.

Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nature medicine*. 2008;14(1):88-92.

Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Journal of immunology*. 2001;167(6):3505-12.

Jones ND, Turvey SE, Van Maurik A, Hara M, Kingsley CI, Smith CH, et al. Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection. *Journal of Immunology*. 2001;166(4):2824-30.

Karman J, Chu HH, Co DO, Seroogy CM, Sandor M, Fabry Z. Dendritic cells amplify T cell-mediated immune responses in the central nervous system. *Journal of Immunology*. 2006;177(11):7750-60.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine*. 2007;13(10):1173-5.

Kingsley CI, Nadig SN, Wood KJ. Transplantation tolerance: lessons from experimental rodent models. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2007;20(10):828-41.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunology today*. 1998;19(12):556-61.

Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for all rejection. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(5):2013-8.

Kroemer A, Xiao X, Degauque N, Edtinger K, Wei H, Demirci G, et al. The Innate NK Cells, Allograft Rejection, and a Key Role for IL-15. *Journal of Immunology*. 2008;180(12):7818-26.

Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*. 2006;11(10):1709-26.

Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, et al. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell death and differentiation*. 2006;13(12):2011-22.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-74.

Kulinna-Cosentini C, Bankier AA. Solid Organ Transplantation: Past, Present, and Future Challenges. *Imaging in Transplantation*. 2007:1-9.

Kupiec-Weglinski JW, Colto AJ, Van De Water L. Extracellular matrix proteins and their interactions with the cellular repertoire of transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 1997;29(6):2601-2.

Kuttler B, Wanka H, Kloting N, Gerstmayer B, Volk HD, Sawitzki B, et al. Ex vivo gene transfer of viral interleukin-10 to BB rat islets: no protection after transplantation to diabetic BB rats. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(4):868-80.

Laboratory TJ. Il10tm1Cgn, Version 1. 2008 11 Jun 2008 [cited 2008 13 Jun 2008]; Available from: http://jaxmice.jax.org/pub/cgi/protocols/protocols.sh?objtype=protocol&protocol_id=346

Lagasse E, Weissman IL. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *Journal of immunological methods*. 1996;197(1-2):139-50.

Larocca R, Marguti I, Cabrera W, Ribeiro OG, Rizzo LV, de Moraes LV. Maximal inflammatory response benefits syngeneic skin graft acceptance. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2008.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(5):1483-93.

Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1995;35:655-77.

Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26(3):371-81.

Lee PC, Shears LL, 2nd, Billiar TR. Role of inducible nitric oxide synthase in transplant arteriosclerosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 1999;26(12):1013-5.

Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology*. 1975;78(1):71-100.

Leibovitch I, Huilgol SC, Hsuan JD, Selva D. Incidence of host site complications in periorbital full thickness skin grafts. *The British journal of ophthalmology*. 2005;89(2):219-22.

Li W, Fu F, Lu L, Narula SK, Fung JJ, Thomson AW, et al. Differential effects of exogenous interleukin-10 on cardiac allograft survival: inhibition of rejection by recipient pretreatment reflects impaired host accessory cell function. *Transplantation*. 1999;68(9):1402-9.

Liang Y, Christopher K, Finn PW, Colson YL, Perkins DL. Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation. *Transplantation*. 2007;84(6):771-7.

Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *The Journal of pathology*. 2002;197(3):322-32.

Lovegrove E, Pettigrew GJ, Bolton EM, Bradley JA. Epitope mapping of the indirect T cell response to allogeneic class I MHC: sequences shared by donor and recipient MHC may prime T cells that provide help for alloantibody production. *Journal of Immunology*. 2001;167(8):4338-44.

Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):597-607.

Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1639(3):141-51.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4.

Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *Journal of anatomy*. 1944;78(Pt 5):176-99.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5566):298-300.

Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica 1981.

Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, et al. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2001;28(10):935-40.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683-765.

Morita K, Miura M, Paolone DR, Engeman TM, Kapoor A, Remick DG, et al. Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection. *Journal of Immunology*. 2001;167(5):2979-84.

Muzio M, Polntarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A. Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway. *European cytokine network*. 2000;11(3):489-90.

Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(5):1258-68.

Nash JR, Peters M, Bell PR. Comparative survival of pancreatic islets, heart, kidney, and skin allografts in rats, with and without enhancement. *Transplantation*. 1977;24(1):70-3.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews*. 2006;6(3):173-82.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*. 1992;6(12):3051-64.

Nogueira E, Ozaki KS, Macusso GD, Quarim RF, Camara NO, Pacheco-Silva A. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 2007;39(2):412-4.

Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(33):12493-8.

Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *Faseb J*. 2005;19(14):2005-7.

Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(14):2005-7.

Oshima K, Cui G, Tung T, Okotie O, Laks H, Sen L. Exogenous IL-10 overexpression reduces perforin production by activated allogenic CD8+ cells and prolongs cardiac allograft survival. *American journal of physiology*. 2007;292(1):H277-84.

Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, et al. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(4):843-9.

Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Herczyk WF, Howell DN, Reinsmoen NL, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(6):628-32.

Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science (New York, NY)*. 2003;299(5609):1033-6.

Peng Q, Li K, Anderson K, Farrar CA, Lu B, Smith RA, et al. Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood*. 2008;111(4):2452-61.

Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch*. 2001;442(4):479-86.

Pfeilschifter J, Eberhardt W, Huwiler A. Nitric oxide and mechanisms of redox signalling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. *European journal of pharmacology*. 2001;429(1-3):279-86.

Platz KP, Mueller AR, Heckert C, Hausler M, Guckelberger O, Lobeck H, et al. Nitric oxide production after syngeneic and allogeneic small bowel transplantation. *Transplantation proceedings*. 1998;30(6):2662-4.

Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977;269(5631):804-6.

Potter NS, Harding CV. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol*. 2001;167(5):2538-46.

Potter NS, Harding CV. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 2001;167(5):2538-46.

Qian S, Li W, Li Y, Fu F, Lu L, Fung JJ, et al. Systemic administration of cellular interleukin-10 can exacerbate cardiac allograft rejection in mice. *Transplantation*. 1996;62(12):1709-14.

Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000;101(4):521-30.

RBT. Registro Brasileiro de Transplantes: Associação Brasileira de Transplantes; 2006 Janeiro/Junho 2006.

Reali E, Guerrini R, Moretti S, Spisani S, Lanza F, Tomatis R, et al. Polymorphonuclear neutrophils pulsed with synthetic peptides efficiently activate memory cytotoxic T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 1996;60(2):207-13.

Rees MA, Rosenberg AS, Singer A. T cell subsets mediating rejection of established fetal pancreas grafts and failure to observe graft adaptation. *Transplantation*. 1990;49(6):1130-3.

Richards DM, Dalheimer SL, Ehst BD, Vanasek TL, Jenkins MK, Hertz MI, et al. Indirect minor histocompatibility antigen presentation by allograft recipient cells in the draining lymph node leads to the activation and clonal expansion of CD4+ T cells that cause obliterative airways disease. *Journal of Immunology*. 2004;172(6):3469-79.

Richters CD, van Gelderop E, du Pont JS, Hoekstra MJ, Kreis RW, Kamperdijk EW. Migration of dendritic cells to the draining lymph node after allogeneic or congenic rat skin transplantation. *Transplantation*. 1999;67(6):828-32.

Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *The Journal of experimental medicine*. 1987;165(5):1296-315.

Rosenberg AS, Mizuochi T, Singer A. Cellular interactions resulting in skin-allograft rejection. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;532:76-85.

Rosenberg AS, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annual review of immunology*. 1992;10:333-58.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2001;2(10):947-50.

Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology*. 2003;4(9):835-42.

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.

Shinozaki K, Yahata H, Hayamizu K, Tashiro H, Fan X, Okimoto T, et al. Adenovirus-mediated allograft transduction of interleukin-10: role in the induction phase of liver allograft acceptance. *Transplantation proceedings*. 2000;32(2):247-8.

Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K. Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene therapy*. 1999;6(5):816-22.

Silverstein A. *Transplantation and Immunogenetics. A history of Immunology* 1989.

Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *Journal of Immunology*. 2002;169(2):642-6.

Steinman L. A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(6):2253-6.

Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunological reviews*. 2005;207:19-30.

Surquin M, Buonocore S, Le Moine A, Flamand V, Goldman M, Abramowicz D. [The role of neutrophils during allograft rejection]. *Nephrologie & therapeutique*. 2005;1(3):161-6.

Tanaka K, Sonoda K, Streilein JW. Acute rejection of orthotopic corneal xenografts in mice depends on CD4(+) T cells and self-antigen-presenting cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(12):2878-84.

Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *Journal of anatomy*. 2006;208(4):459-70.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2007;51(3):443-52.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.

Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends in immunology*. 2006;27(8):358-61.

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World journal of gastroenterology* 2007;13(22):3056-62.

Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2008;214(1):104-13.

Vos IH, Joles JA, Schurink M, Weckbecker G, Stojanovic T, Rabelink TJ, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection. *European journal of pharmacology*. 2000;391(1-2):31-8.

Waldmann H. Transplantation tolerance-where do we stand? *Nature medicine*. 1999;5(11):1245-8.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology*. 2007;25:821-52.

Werb Z, Gordon S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 1975;142(2):346-60.

WHO. Human organ and tissue transplantation: World Health Organization; 2003 May 2003.

Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, Vassileva G, et al. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *Journal of Immunology*. 2001;166(12):7563-70.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology*. 2007;8(9):950-7.

Winlaw DS, Schyvens CG, Smythe GA, Du ZY, Rainer SP, Lord RS, et al. Selective inhibition of nitric oxide production during cardiac allograft rejection causes a small increase in graft survival. *Transplantation*. 1995;60(1):77-82.

Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS. Nitric oxide production and heart failure. *Lancet*. 1995;345(8946):390-1.

Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-93.

Worrall NK, Boasquevisque CH, Botney MD, Misko TP, Sullivan PM, Ritter JH, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates functional and histological changes of acute lung allograft rejection. *Transplantation*. 1997;63(8):1095-101.

Wyburn K, Wu H, Yin J, Jose M, Eris J, Chadban S. Macrophage-derived interleukin-18 in experimental renal allograft rejection. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2005;20(4):699-706.

Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation*. 2005;80(12):1641-7.

Xiao BG, Link H. Antigen-specific T cells in autoimmune diseases with a focus on multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Cellular and molecular life sciences*. 1999;56(1-2):5-21.

Yang YG, Wang H, Asavaroengchai W, Dey BR. Role of Interferon-gamma in GVHD and GVL. *Cellular & molecular immunology*. 2005;2(5):323-9.

Young JW, Merad M, Hart DN. Dendritic cells in transplantation and immune-based therapies. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(1 Suppl 1):23-32.

Youssef AR, Otley C, Mathieson PW, Smith RM. Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine skin and heart allograft rejection across different antigenic disparities. *Transplant immunology*. 2004;13(4):297-304.

Zhai Y, Wang Y, Wu Z, Kupiec-Weglinski JW. Defective alloreactive CD8 T cell function and memory response in allograft recipients in the absence of CD4 help. *Journal of Immunology*. 2007;179(7):4529-34.

Zhang Z, Fauser U, Schluesener HJ. Expression of RhoA by inflammatory macrophages and T cells in rat experimental autoimmune neuritis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(1):111-9.

Zhao Y, Swenson K, Wekerle T, Rodriguez-Barbosa JI, Arn JS, Sykes M. The critical role of mouse CD4+ cells in the rejection of highly disparate xenogeneic pig thymus grafts. *Xenotransplantation*. 2000;7(2):129-37.

Zheng XX, Steele AW, Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *Journal of Immunology*. 1995;154(10):5590-600.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007;445(7128):648-51.

Zhong J, Hadis U, De Kluyver R, Leggatt GR, Fernando GJ, Frazer IH. TLR7 stimulation augments T effector-mediated rejection of skin expressing neo-self antigen in keratinocytes. *European journal of immunology*. 2008;38(1):73-81.

Zou XM, Yagihashi A, Hirata K, Tsuruma T, Matsuno T, Tarumi K, et al. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by interleukin-10. *Surgery today*. 1998;28(2):184-91.