FLÁVIO HENRIQUE FERREIRA GALVÃO

**MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DO ENXERTO VERSUS
HOSPEDEIRO APÓS TRANSPLANTE DE INTESTINO DELGADO**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Medicina**

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg

**SÃO PAULO
1997**

Carne

Yos - Gado. E. ALVES
20/05/97

inflashauto

MARIA APARECIDA DE L. CASTRO SANTOS
Bibl. Superv. Saúde - CRB-00124
Serviço de Indexação Publ. Teol. Católica
Serv. Biol. Doc. - Fac. Medicina USP

204.0123
S1.001
F11-2
G171m

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Galvão, Flávio Henrique Ferreira

Modelo experimental de doença do enxerto versus hospedeiro após
transplante de intestino delgado / Flávio Henrique Ferreira Galvão. — São
Paulo, 1997.

Tese (doutorado) — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1. INTESTINO DELGADO/transplante 2. DOENÇA ENXERTO-
HOSPEDEIRO/cirurgia 3. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS
4. IMUNOSSUPRESSÃO/métodos 5. CITOCINAS/immunologia 6. QUIMERA

USP/FM/SBD-252/97

A minha mãe, Sra. Maria do Socorro
Ferreira Galvão pela educação e pelos
bons exemplos de dignidade e coragem.

AGRADECIMENTOS.

- Ao Conselho Federal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, órgão do governo brasileiro que financiou parte desta pesquisa.
- Aos Profs. Drs. Noriko Murase, Satoru Todo professores Associados do Departamento de Cirurgia da Universidade de Pittsburgh, co-orientadores, pela confiança na indicação de meu nome para a realização deste trabalho e pelas brilhantes considerações.
- Ao Prof. Dr. Thomas E. Starzl, criador do Instituto Thomas E. Starzl de transplante da Universidade de Pittsburgh, pioneiro na descobertas de avanços na área de transplante que propiciaram o uso corriqueiro deste método terapêutico, por dar condições a realização deste trabalho em seu Instituto e pelas oportunas considerações.
- Ao Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg, de quem tive o privilégio de ser orientado pela segunda vez, sempre presente e participativo em todas as etapas desta pesquisa, pelas brilhantes considerações e amizade fraternal.
- A Prof. Dra. Qing Ye, pesquisadora associada do Instituto Thomas E. Starzl de transplante da Universidade de Pittsburgh e ao Sr. Christopher Doughton, biólogo da mesma instituição, pela ajuda na realização da reação mista de linfócitos e da citometria de fluxo.
- Aos Drs. Lian Fu Wang, Jane Cai e Profa. Dra. Adriana Zeevi, molecular biologists do Departamento de Patologia da Universidade de Pittsburgh, pela ajuda na realização e interpretação da reação em cadeia da polimerase para dosagem de citocinas.
- Ao Profs. Drs. Anthony Jack Demetris e Kenneth Lee, Professores Associados do Departamento de Patologia da Universidade de Pittsburgh, pela análise histopatológica.
- Aos Prof. Dr. Joaquim José Gama Rodrigues e Profa. Dra. Angelita Habr Gama, pela formação na área de cirurgia do aparelho digestivo e pelas oportunidades profissionais a mim oferecidas exemplificadas pela indicação de meu nome para realização de estágio na Universidade de Pittsburgh no segundo semestre de 1991.
- Ao Prof. Dr. Silvano Mario Atilio Raia, renomado cientista da área de transplante, Prof. Titular da Disciplina de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter aberto as portas de seu grupo de transplante do qual me orgulho de fazer parte.
- A todos os funcionários e pacientes da Unidade de Fígado da Disciplina de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo carinho pelo qual me receberam e pelo estimulante e cordial relacionamento de trabalho.
- Ao meu irmão Dr. Carlos Augusto Ferreira Galvão, psiquiatra e escritor, pela ajuda na redação deste texto.

RESUMO

A doença do enxerto versus hospedeiro (DEVH) é uma grave complicação do transplante de órgãos sólidos, com alta mortalidade. Seu estudo tem sido limitado pela carência de modelos experimentais apropriados. Descreve-se um modelo de DEVH baseado no aumento do quimerismo, sua evolução clínica, histopatológica, do número das células quiméricas, do perfil das citocinas e da tolerância imunológica. Ratos Lewis (LEW) foram submetidos a transplante simultâneo de intestino delgado e medula óssea provenientes de ratos ACI (grupo de estudo - E) ou LEW (grupo controle - C), tratados com FK-506 (1mg/Kg/dia) entre o 0 e 13° PO, e uma dose semanal daí por diante. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: E1- 6 ratos sacrificados no 120° PO. E2- 8 ratos após apresentarem sinais clínicos graves de DEVH entre o 189° e o 271° PO. Como controle, ratos LEW foram receptores dos mesmos tipos de enxertos provenientes de ratos LEW, submetidos à mesma imunossupressão e foram assim divididos: C1- 6 ratos sacrificados no 120° PO, C2- 5 ratos sacrificados entre o 223° e o 270° PO. A citometria de fluxo foi realizada para quantificar a porcentagem das células linfóides de ACI doadores no sangue periférico nos E1, E2 em 6 períodos: 30° PO, 65° PO, 95° PO, 120° PO, 160° PO, 200° PO. Os animais foram examinados 2 vezes por semana à procura de sinais de DEVH (rash cutâneo, perda de peso, de pelo e hiperqueratose). No sacrifício dos animais do grupo E1 e C1, foram colhidas amostras de língua (LI), de linfonodos cervicais (LC), intestino delgado do receptor e do enxerto para análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α por meio da reação em cadeia da polimerase. Em todos os grupos foram também colhidas amostras destes órgãos para histopatologia e nos animais do grupo E2 linfonodos cervicais foram processados para análise da reatividade celular por meio da reação mista dos linfócitos (MLR). A evolução clínica e histopatológica foi graduada de 0 a 3 de acordo com a severidade dos sintomas e do infiltrado mononuclear das amostras. Os ratos dos grupos E1 e E2 iniciaram sinais da DEVH entre o 84° e 115° PO. Os ratos dos grupos C1 e C2 não apresentaram evidência de DEVH. Amostras de LI e LC dos ratos do grupo E1 apresentaram alterações histopatológicas grau 2 e do grupo E2 apresentaram alterações histopatológicas grau 3, respectivamente. Nenhuma alteração histopatológica foi encontrada nos ratos do grupo controle e em amostras do ID. Nenhuma alteração histopatológica foi encontrada no intestino delgado do receptor e do enxerto. O aumento da porcentagem de células do doador no sangue periférico do receptor foi progressivo chegando a $5.4 \pm 2.3\%$ no 1o período, $21 \pm 4.6\%$ no 3o período e $39.3 \pm 4\%$ no 6o período. IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α estiveram aumentados em língua e IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em linfonodos cervicais. Os linfócitos de ratos do grupo E2 mostraram hiporreatividade aos de ratos ACI e hiperreatividade aos de ratos PVG (terceira parte) denotando tolerância imunológica. Neste modelo experimental há uma inexorável evolução imunológica para DEVH; existe correlação direta entre o aumento do quimerismo em sangue periférico e da expressão de citocinas em língua e linfonodos cervicais e a severidade da DEVH, além da indução de tolerância imunológica do rato do grupo E2 quimérico ao rato ACI normal.

SUMMARY

Graft-versus-host disease (GVHD) has been a major concern after small bowel transplantation (SBTX) and the lack of suitable experimental models has limited the study of GVHD after solid organ transplantation. Here we describe a relevant experimental model of GVHD after fully allogeneic SBTX based on chimerism augmentation, its clinical and histopathological evolution, cytokine involvement, responsible donor cell and immunologic tolerance analysis. LEW rat recipients received orthotopic SBTX and simultaneous donor bone marrow cell infusion (250×10^6), from ACI rats (experimental group - E) or LEW (control group C). FK-506 was administered daily at a dose of 1mg/kg on day 0 to 13, then continued as a weekly injection of same dose until the experimental end point. The recipients were divided in the following groups: E1 - 6 rats sacrificed at 120° POD. E2 - 8 rats sacrificed with critical GVHD between DPO 189 to 271. LEW recipient of LEW grafts, under the same immunosuppression were used as control and divided as: C1 - 6 rats sacrificed at POD 120; C2- 5 rats sacrificed between 223 and 270 POD. the number of donor cell in the recipient circulation was determined by flowcytometry in 6 pos-operative time: 30, 65, 95, 120, 160, 200. The rats were analysed twice a week for body weigh and serching for signs of GVHD (cutaneous rush, hiperkeratosis and loss of hair and body weigh). At the sacrificed, samples from tongue (TG), cervical lymph node (CLN), donor (SBD) and recipient (SBR) small bowel were taken from all animals for histopathology and from E1 and C1 animals for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α cytokines analysis using reverse transcription polymerase chain reaction. Samples from cervical lymph nodes of 5 animals from group E2 were used for mixed lymphocyte reaction for tolerance analysis. The clinical and histopathological evolution of the disease were avaluated from degree 0 to 3 according to the severity. GVHD in E1 and E2 animals started between 84 and 115 POD. Histopathological analysis of TG and CLN showed that E1 animals present GVHD grade 2 and E2 animals grade 3. The increase of donors cells in the recipient circulation was progressive and account for $5.4 \pm 2.3\%$ at POD 30, $21.4 \pm 4.6\%$ at POD 95 and $39.3 \pm 4\%$ at POD 200. IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α were upregulated in CLN and IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α were upregulated in TG when compared with the respective controls. The lymphocytes from E2 group showed hyporeactivity to lymphocytes of normal ACI and hypereactivity to those of PVG, meaning tolerance. No cytokines alteration was noted in SBD neither SBR. Animals from group C1 and C2 did not present any sign of disease. This result show that GVHD is a inexoravel evolution under the experimental conditions of this study and the evolution of the disease is near correlated with the augmentation of the donor cells in the recipient circulation and upregulation of cytokines gene expression in target organs. Tolerance to the same donor strain lymphocytes was also noted.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. MÉTODO	
3.1. Animal de experimentação	6
3.2. Grupos do experimento	6
3.3. Planejamento Experimental	6
3.4. Técnica operatória microcirúrgica do transplante ortotópico de intestino delgado (TID)	
3.4.1. Operação do doador	7
3.4.2. Perfusão e preservação	8
3.4.3. Operação do receptor	8
3.5. Transplante de Medula Óssea (TMO)	9
3.6. Imunossupressão e Antibioticoterapia	10
3.7. Avaliação Clínica da DEVH	10
3.8. Final do Experimento	10
3.9. Análise da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de diferentes citocinas	
3.9.1. Extração do mRNA	11
3.9.2. Transcrição reversa	12
3.9.3. Reação em cadeia da polimerase [polimerase chain reaction (PCR)]	12
3.10. Citometria de fluxo	13
3.11. Reação mista dos linfócitos	15
3.12. Estudo Histopatológico	16
3.12.1. Língua	16
3.12.2. Linfonodo cervical	17
3.12.3. Intestino delgado	17
3.13. Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS	
4.1 Evolução pós-operatória e autópsia	
4.1.1. Peso corpóreo	18
4.1.2. Evolução clínica da DEVH	18
4.1.3. Autópsia	19
4.2. Citometria de fluxo	19

4.3. Resultados da expressão genética (mRNA) da IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ	19
4.4. Resultados da Reação Mista dos Linfócitos	20
4.5. Resultados da Análise Histopatológica	20
5. DISCUSSÃO	
5.1. Do modelo experimental	32
5.2. Das Citocinas	38
5.3. Do Quimerismo e Tolerância	41
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo transplante de intestino delgado (TID) remonta há quase um século, quando foram descritas as primeiras tentativas da realização do transplante intestinal (16). Contudo, as bases experimentais da técnica operatória e da fisiopatologia desse transplante só vieram 57 anos mais tarde com os trabalhos de LILLEHEI e col. nos TID isolado (61), e STARZL e col. no enxerto multivisceral, onde o intestino delgado foi transplantado em combinação a estômago, pâncreas, fígado e intestino grosso (102).

Os primeiros TID clínicos ocorreram na década de 60 e início da década de 70 (35, 62, 75), destacando-se Okumura e col. (75) no Hospital das Clínicas da FMUSP. Nessa época a maior sobrevida destes transplantes foi de 72 dias (35). Já nas primeiras tentativas, ficou evidente que o TID cursa com baixa sobrevida e este fato relacionou-se com infecção e com a intensa reação imunológica inerente a este órgão devido sua grande imunogenecidade.

O intestino delgado é um dos maiores órgãos imunológicos do organismo, devido o GALT (do inglês, gut associated lymphoid tissue - tecido linfóide associado ao intestino), que consiste de linfonodos mesentéricos, placa de Peyer, e células imunocompetentes presentes nos compartimentos mesenquimal (foliculos linfóides da parede intestinal), epitelial e endotelial (células apresentadoras de antígeno). Estas células são capazes de deflagrar intensa reação imunológica, não só do hospedeiro contra o enxerto, mas também, por sua contrapartida imunológica, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DEVH). Estes dois tipos de reação imunológica interagem entre si, formando complexos imunológicos fortemente reativos, que necessitam intensa imunossupressão para serem controlados (93, 116, 117).

Os estudos experimentais do TID tiveram grande avanço após a descrição de sua técnica microcirúrgica em ratos em 1971 (69). Este animal possibilitou melhor entendimento dos problemas imunológicos (69, 108, 109), e também de outras grandes dificuldades associadas ao TID como infecção generalizada associada a forte esquema de imunossupressão e a translocação bacteriana (79, 80) e o baixo tempo de preservação do intestino, (39, 41, 43), que continuam desafiando a comunidade científica mundial.

Novas descobertas no campo da imunologia, biologia molecular e farmacologia imunossupressora, aliadas aos notáveis avanços na tecnologia de terapia intensiva, reviveram, neste final de século, a possibilidade de indicação do TID para os estágios finais de falência entérica (24, 46, 47, 79).

Em maio de 1990, o Centro Médico da Universidade de Pittsburgh iniciou o programa clínico do TID. Sua experiência atual, conta com mais de 90 casos realizados (37, 115). Os recentes resultados deste programa mostraram 50% dos pacientes vivos e sobrevida total para o 1º, 2º e 4º ano pós transplante de 71%, 55% e 42%. A porcentagem dos enxertos funcionantes nos mesmos períodos foi de 62%, 47% e 34% respectivamente (37, 115).

A maior parte das complicações, descritas pelo grupo de Pittsburgh, esteve fortemente relacionada ao intenso uso de drogas imunossupressoras como Tacrolimus (FK-506), esteróides, ciclofosfamida e OKT3 para o controle das reações imunológicas

provocadas pelo transplante. Submetidos a intensa imunossupressão, os enfermos apresentaram morte relacionada com infecção generalizada, falência de múltiplos órgãos, pneumonia (bacteriana, viral e fúngica), síndrome da angústia respiratória do adulto, doença do enxerto versus hospedeiro (DEVH) e doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) (37, 115). Ainda nesta série, as principais causas de falência do enxerto que obrigou sua retirada foram, respectivamente: rejeição, infecção, doença linfoproliferativa pós-transplante e problemas técnicos (37, 115). Pode-se inferir que a gravidade das complicações citadas reflete o impasse entre a necessidade de intensa imunossupressão devido ao transplante de um órgão fortemente imunogênico de um lado, e a perda do enxerto por baixa tolerância do receptor ao intestino transplantado de outro.

Recentemente surgiram conceitos relativos à migração de células (linfócitos passageiros) e quimerismo como meios favoráveis à indução da tolerância imunológica (25, 56, 84, 96-101), despontando como nova esperança para melhor controle dos fenômenos de rejeição nos transplante de órgãos.

A tolerância imunológica no transplante de órgão consiste na aceitação do enxerto pelo organismo receptor com pouca, ou mesmo nenhuma agressão imunológica do órgão transplantado e representa assim o transplante ideal: sem uso de droga imunossupressora (56).

As premissas da teoria de tolerância imunológica, iniciaram-se nos anos 50 com os trabalhos do pesquisador nascido no Brasil e radicado na Inglaterra, Peter B. Medawar, laureado com o Nobel da medicina de 1960 (8, 11, 67). Após um período de latência nos anos 70-80, a teoria da indução da tolerância imunológica por meio de interação celular (quimerismo) ressurgiu, após as importantes descobertas do grupo de Pittsburgh chefiado por Starzl (25, 84, 96-101).

Apoiados nos avanço tecnológico principalmente nas áreas de biologia molecular (advento da reação em cadeia da polimerase [PCR]) bioquímica (imunohistoquímica, citometria de fluxo simples e de duplo contraste) e engenharia genética, tornou-se possível a identificação de células imunocompetentes do doador (linfócitos passageiros) que migram para o organismo do receptor, assestando-se principalmente em órgãos linfáticos e, diferentemente do que se pensava anteriormente, permanecem vivas por vários anos ou mesmo décadas (25, 56, 84, 96-101).

As células imunocompetentes do enxerto (macrófagos, células dendríticas do sistema imunológico, linfócitos de tecidos, células apresentadoras de antígeno do endotélio vascular, células progenitoras do sistema imunológico) são substituídas por células equivalentes do receptor. Assim ocorre uma migração celular bidirecional, de início imediatamente pós-reperfusão, que vai transformar, enxerto e receptor, em quimeras (25, 56, 84, 96-101).

O íntimo contato de células geneticamente diferentes, ao conviver em estado de não agressão propiciado por drogas imunossupressoras, podem induz uma hiporesponsividade específica destas células entre si, culminando com a aceitação do órgão transplantado pelo organismo do hospedeiro (tolerância imunológica) (25, 56, 84, 96-101).

A tolerância imunológica tem permitido que alguns pacientes transplantados permaneçam por vários anos sem episódios de rejeição, mesmo sem esquema de imunossupressão (101). Contudo, normalmente este fenômeno é lento e na prática clínica

ele não é evidenciado antes de 10 anos pós transplante. Assim os protocolos atuais de interrupção da administração de drogas imunossupressoras só são considerados após 5 anos de bom funcionamento do enxerto sem nenhum sinal de complicação imunológica (83, 90, 100).

Com o intuito de induzir tolerância imunológica mais precocemente, novas pesquisas foram delineadas, para estudar o comportamento imunológico em condições de transplantes simultâneos de órgão sólido e de medula óssea do mesmo doador, aliados a imunossupressão adequada (68, 73). Estes estudos observaram que, com esta metodologia, é possível aumentar o quimerismo natural e facilitar precocemente a tolerância imunológica (68, 73). Assim, a conduta do transplante simultâneo de órgão sólido e medula óssea vem sendo adotada em vários programas clínicos com resultados promissores (7, 32).

Muito embora a facilitação da tolerância imunológica obtida pelo método do transplante simultâneo para aumento do quimerismo identificou-se, experimentalmente, maior frequência do aparecimento da DEVH (73). Esta doença ocorreu principalmente nos enxertos de fígado e intestino delgado que, por serem órgãos com elevada capacidade imunogênica, já promovem uma intensa transferência de células imunocompetentes quando transplantados isoladamente (73).

Os requerimentos básicos para o desenvolvimento da DEVH foram definidos por Billingham em 1966 (10). Segundo este autor para o desenvolvimento desta doença, células imunocompetentes devem ser transferidas do doador para o receptor, e o receptor deve expressar antígenos tissulares não presentes no doador. Além disso, o receptor deve ser incapaz de realizar uma resposta efetiva no sentido de rejeitar ou destruir estas células transplantadas.

Deste modo a DEVH ocorreria não só em transplante alogênico de medula óssea, mas também em órgãos ricos em tecido linfóide ou em células progenitoras do sistema imunológico (stem cells), que tem a capacidade de se diferenciar em células linfóides. Nesta situação ocorre proliferação de células imunocompetentes do doador, que promovem ataque imunológico a órgãos alvos do hospedeiro como pele, mucosas, intestino, fígado, pulmão, órgãos linfáticos, etc. Estas alterações caracterizam-se clinicamente por *rash* cutâneo e de mucosa, sintomas gastrointestinais (diarréia e dor abdominal), redução da crase sangüínea e hepatite reacional (10, 23, 31).

A nova visão da fisiopatologia da DEVH descreve duas fases na evolução desta doença. Na fase inicial ou aferente, linfócitos nulos (resting T lymphocytes), são estimulados por antígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos em conjunção com um "segundo sinal" representado pela interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Isto conduz a ativação dos linfócitos T com expressão do receptor de IL-2 e secreção autocrina de IL-2, seguida de proliferação e diferenciação clonal destas células (23, 31). Na segunda fase ou fase eferente ocorre disregulação das citocinas, desencadeando proliferação de linfócitos do doador, que leva a lesão tecidual e morte de células alvo (principalmente do parênquima hepático, linfonódos e células epiteliais de pele, mucosas e intestino delgado), classicamente na forma de apoptose (codificação de morte celular por degranulação). É também evidente a participação de células como as dendríticas, células citotóxicas naturais (Natural Killer-NK), macrófagos e linfócitos T citotóxicos na mediação da lesão tecidual (23, 31).

Assim, sabe-se que a DEVH não é só um fenômeno celular, mas sua manifestação imunológica é mediada (ampliada e modulada) por citocinas. As citocinas são mediadores celulares que regulam a intensidade, duração e eventual efeito da reação imunológica nos transplantes, além disso algumas delas, principalmente as liberadas por linfócitos auxiliares TH2 (IL-10 e IL-4), são relacionadas a tolerância imunológica (19, 30). No entanto, o estudo das citocinas na DEVH após transplante de órgão sólido permanece muito pouco esclarecido.

Em seres humanos, a DEVH aparece em cerca de 50% dos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea e, naqueles que apresentam sinais clínicos graves desta doença, a taxa de mortalidade chega a 90% (34, 45, 49, 89). Nos últimos anos, um número crescente de publicações relata DEVH também após transplante de órgão sólido, principalmente fígado e intestino delgado, com morbidade e mortalidade semelhantes as observadas para o transplante de medula óssea (8, 14, 37, 47, 54, 85, 86, 115). Estes maus resultados estimulam o desenvolvimento de novos modelos experimentais que reproduzam de forma adequada esta doença e que propiciem padronizações mais precisas de tratamento.

O tratamento da DEVH é muito difícil e sua abordagem terapêutica é controversa. Geralmente aumenta-se a imunossupressão, aumentando também os riscos de infecção (17, 85). Novos protocolos utilizando imunomodulação por transplante de células (tratadas ou não) provenientes da medula óssea ou anticorpos monoclonais antagonista de TNF- α , IL-1R, IL-2R obtiveram bons resultados, porém com pouca significância na prática clínica (17, 52, 66, 82, 85).

Em recentes experimentos, desenvolvemos um novo modelo para a obtenção experimental da DEVH (44, 119). Nestes trabalhos praticou-se transplante simultâneo de intestino delgado e medula óssea e imunossupressão contínua com FK-506 entre 2 cepas de ratos isogênicos (ACI doadores, Lewis receptores) fortemente alogênicos entre si. Verificou-se que os 100% dos animais receptores de ambos os enxertos apresentaram sinais clínicos de DEVH no pós-operatório, tendo todos eles evoluído inexoravelmente para a letalidade (44, 119).

O modelo pioneiro de DEVH após transplante de órgão sólido acima descrito é de grande significância, pois se baseia na interação celular bidirecional entre o enxerto e o hospedeiro (quimerismo), mimetizando os sinais clínicos e histopatológicos da evolução desta doença (44, 119).

Torna-se de grande interesse caracterizar o modelo experimental em que a DEVH seja induzida pela alteração natural do quimerismo, em termos de seu comportamento imunológico correlacionado com a evolução clínica e histopatológica ao longo do tempo. A caracterização mais apurada deste modelo experimental de DEVH poderá contribuir para o estudo dos fenômenos imunológicos desta doença e para a programação de estratégias de seu tratamento.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é caracterizar o comportamento imunológico e histopatológico da doença do enxerto versus hospedeiro provocada por transplante simultâneo de intestino delgado e medula óssea entre cepas de ratos fortemente alogênica, sob imunossupressão contínua com FK-506.

3. MÉTODO

3.1. *Animal de experimentação*

Utilizou-se 78 ratos (*Ratus norvegicus*, Rodentia, Mamalia) isogênicos, machos, de quatro semanas de idade, pesando 220-250g, das seguintes raças: ACI (SegHsd-RT1^l) - 22 animais; Lewis (LEW, SsNHsd-RT1^a) - 48 animais e PVG (OlaHsd-RT1^c) 8 animais, todos provenientes da companhia Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, Indiana).

3.2. *Grupos do experimento:*

Todos os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro diferentes grupos e o número mínimo de 5 animais por grupo foi estabelecido previamente para a viabilização da análise estatística. Os 4 grupos foram divididos em dois subgrupos: dois grupos de estudo (E) e dois grupos controle (C), baseado na combinação de ratos (alogênica - estudo, isogênica - controle) e no tempo de sacrifício destes animais.

Grupo E1: Seis ratos LEW receberam enxertos simultâneos de intestino delgado e medula óssea, ambos provenientes de ratos ACI. O sacrifício ocorreu no 120º dia de pós operatório (DPO).

Grupo E2: Oito ratos LEW receptores de enxertos simultâneos de intestino delgado e medula óssea provenientes de ratos ACI foram mantidos vivos e só sacrificados quando apresentaram-se gravemente doentes devido a DEVH.

Grupo C1: Seis ratos LEW receptores de enxertos simultâneos de intestino delgado e medula óssea provenientes de ratos LEW foram sacrificados no 120º DPO.

Grupo C2: Cinco ratos LEW receptores de enxertos simultâneos de intestino delgado e medula óssea provenientes de ratos LEW foram sacrificados com longa sobrevida em, DPO semelhante ao de sacrifício para o grupo E2.

3.3. *Planejamento Experimental:*

Vinte e cinco ratos LEW receberam transplantes simultâneos de intestino delgado e medula óssea de ratos doadores. Os animais doadores foram 14 ratos ACI (grupo de estudo-transplante alogênico) e 11 ratos LEW (grupo controle-transplante isogênico). Os grupos C1 e C2 foram controles dos grupos E1 e E2 respectivamente. Todos os animais foram mantidos no biotério da Torre de Ciências Biomédicas da Universidade de Pittsburgh em salas com ambiente estéril, e sob temperatura constante de 25 graus centígrados (°C) por uma semana anteriormente a data de sua utilização experimental.

Os ratos receptores foram mantidos em regime de imunossupressão contínua com FK506 e observados semanalmente quanto sua evolução clínica.

Os ratos LEW corresponderam aos animais receptores de enxertos simultâneo de intestino delgado e medula óssea do mesmo doador, de ratos ACI ou LEW e foram

mantidos em jejum de 12 horas antes do procedimento microcirúrgico. Após os transplantes, os animais permaneceram na sala de pequenos animais do Instituto Thomas Starzl de Transplante da Universidade de Pittsburgh sob temperatura constante de 25 graus centígrados e ciclo diuturno de luz, até o dia de sacrifício.

Os ratos PVG foram usados como doadores de células durante a realização do método de cultura mista de linfócitos.

Sangue periférico dos animais do grupo de estudo foi analisado por citometria de fluxo para pesquisa de células imunocompetentes circulantes do rato doador em 6 diferentes períodos evolutivos de pós-operatório (análise do quimerismo).

Os animais receptores (grupo de estudo e grupo controle) foram sacrificados em 2 momentos diferentes, de acordo com a especificação de cada grupo: No momento 1, doze animais (seis do grupo de estudo e seis do grupo controles) foram sacrificados no 120º DPO e no momento 2, treze animais (oito do grupo de estudo e cinco do grupo controle) foram sacrificados com longa sobrevivência (DPO 222 ± 27 no grupo E2 e DPO 219 ± 26.9 no grupo C2).

Nos animais receptores sacrificados no momento 1, amostras do intestino delgado do doador e receptor, linfonodos cervicais e língua foram estudados quanto a sua histopatologia e presença das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ analisadas por reação em cadeia da polimerase.

Nos animais receptores sacrificados no momento 2, amostras do intestino delgado do receptor e do enxerto, dos linfonodos cervicais e língua foram estudados quanto a sua histopatologia. Nos animais do grupo de estudo (LEW receptores de enxertos de ACI), isolou-se linfócitos provenientes de linfonodos cervicais para estudo da reatividade destas células em relação a linfócitos de ratos LEW, ACI e PVG normais, por meio da reação mista de linfócitos, objetivando pesquisa de ativação alogênica ou tolerância imunológica.

3.4. Técnica operatória microcirúrgica do transplante ortotópico de intestino delgado (TID)

O procedimento microcirúrgico foi realizado no laboratório de microcirurgia vascular do Instituto Thomas E. Starzl de Transplante do Departamento de Cirurgia da Universidade de Pittsburgh com utilização de instrumental microcirúrgico e microscópio para microcirurgia Zeiss 70. Adotou-se técnica microcirúrgica de TID em ratos de Monchick e Russel (69), modificada (40, 109).

3.4.1. Operação do doador:

Os ratos foram anestesiados por via inalatória com Metoxiflurano (Abbott). Após tricotomia da região ventral e anti-sepsia com Betadine, os animais anestesiados e em decúbito dorsal horizontal foram submetidos a laparotomia mediana xifopúbica. Inspeccionou-se os órgãos da cavidade abdominal com especial atenção para o tubo digestivo. A seguir seccionou-se todo o mesocolon com prévia ligadura de suas arcadas vasculares (cólica esquerda, média, direita e ileocecólica) com fio de algodão 6.0.

A parte distal da veia mesentérica superior e a veia porta (VP) em toda a sua extensão foi dissecada com aumento de 6 e 10 vezes, por meio da abertura do mesoduodeno excluindo-se o tecido pancreático adjacente, juntamente com ligadura e secção das veias tributárias (veias pancreatoduodenal, pilórica, esplênica e gástrica esquerda). Esta dissecção prolongou-se até o hilo hepático. A seguir, com o mesmo aumento da dissecção venosa, seccionou-se o peritônio posterior progredindo na dissecção da aorta abdominal (AA) e da artéria mesentérica superior (AMS). Em consequência ligou-se a artéria renal direita, que é emergente da AA, sempre próxima a AMS. A dissecção da AA prolongou-se cranialmente até o tronco celiaco e caudalmente até a artéria renal esquerda. Nesta fase da dissecção, o ID ficou ligado ao abdômen apenas pelo seus pedículos vasculares (AMS e VP) e pela continuidade com o tubo digestivo (estômago e ceco). Progrediu-se com o pinçamento da AA logo abaixo do tronco celiaco e ligadura da AA abaixo deste pinçamento com fio de algodão 6.0. Seccionou-se a AA abaixo do pinçamento e abaixo da emergência da AMS obtendo-se assim AMS íntegra e em continuidade com manguito aórtico. A VP foi também seccionada junto ao hilo hepático. O ID foi seccionado no seu segmento jejunal abaixo do ângulo de fixação duodeno-jejunal e no segmento ileal próximo ao ceco.

3.4.2. Perfusão e preservação

O segmento intestinal obtido foi imediatamente retirado da cavidade peritoneal e o manguito aórtico cateterizado com gelco nº 22 conectado a uma seringa de 10 ml contendo ringer lactato na temperatura de 40°C. Perfundiou-se o leito intra-vascular do intestino com 6 ml desta solução numa velocidade de perfusão constante de 3 ml/minuto. A solução de ringer lactato entrou pela AA e saiu pela VP praticando a lavagem intra-vascular. Depois, introduziu-se na extremidade jejunal o bico de uma seringa hipodérmica de 20 ml, contendo 20 ml de solução de dextrose a 5% acrescida de neomicina a 5%, na temperatura de 40°C, para a lavagem do leito intestinal intraluminal. A seguir, o intestino já lavado e resfriado, foi gentilmente imerso em 40 ml de ringer lactato a 40°C contido em frasco Beker de 50 ml e mantido em geladeira de isopor contendo gelo.

3.4.3. Operação do receptor.

Imediatamente após a cirurgia do doador, procedeu-se a intervenção cirúrgica no receptor. Os animais foram submetidos ao mesmo preparo descrito para a cirurgia do doador. Após laparotomia mediana e inspeção da cavidade abdominal, rebateu-se os intestinos delgado e grosso para a região superior do abdome expondo-se o retro-peritônio. Após abertura do peritônio posterior, a aorta abdominal e a veia cava inferior (VCI) foram dissecadas abaixo dos vasos renais. Cada um destes vasos foi ocluído com duas pinças vasculares de microcirurgia, delimitando uma área de cerca de 1 centímetro de extensão. Procedeu-se a abertura longitudinal de cerca de 1 mm da AA e da VCI na área pinçada e o sangue ali represado foi lavado com solução salina. O enxerto intestinal foi posicionado no flanco direito e, a seguir, foram realizadas anastomoses contínuas com fio Dermalon IO-O (Stuart Drug Inc.), aorto-aórtica e porto cava com aumento de 16 vezes. Retirados os clamps vasculares, o enxerto apresentou reperfusão sangüínea imediata. Sangramentos discretos pelas anastomoses e pelos vasos da arcada marginal intestinal

foram facilmente controlados por compressão com cotonetes e por ligaduras de fio de algodão 7-0 respectivamente. O intestino delgado do animal receptor foi removido após ligadura e secção de seu mesentério e secção do jejuno 10 cm distalmente ao ângulo de fixação duodeno-jejunal. O íleo foi seccionado cerca de 15 cm proximalmente ao ceco para facilitar posterior acesso ao íleo distal do receptor por ocasião da necrópsia pós-sacrifício. Os segmentos intestinais foram todos mensurados pela borda antimesentérica. Posteriormente praticaram-se as anastomoses jejuno-jejunal e ileo-ileal com pontos separados de fio Novafil 7.0 (Stuart Drug Inc.) com aumento de 6 vezes, recontruindo-se assim o trânsito intestinal destes animais. Finalmente procedeu-se lavagem da cavidade abdominal com solução fisiológica morna e o fechamento da parede abdominal em 2 planos com fio Dexon 4.0 (Stuart Drug Inc.). Após o transplante, os animais foram mantidos em ambiente aquecido a 35°C até sua total recuperação anestésica, quando foram transferidos para a sala de pequenos animais com água "ad libitum", e alimentados com ração padrão após 36 horas de cirurgia.

3.5. *Transplante de Medula Óssea (TMO)*

Após o sacrifício dos animais doadores por exsanguinação, os seus membros superiores e inferiores foram removidos por meio de incisão de pele e partes moles ao redor da raiz da coxa e do ombro e desinserção das articulações coxo-femural e escapulo-umeral. Os ossos fêmur, tíbia e úmero, direito e esquerdo, foram isolados, limpos das partes moles e a seguir imersos em tubo de 50ml contendo o seguinte meio de cultura celular estéril e gelado: 30 ml de RPMI 1640 suplementado com 25 mM de tampão Hepes (Hepes buffer), 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml penicilina G e 50 mg/ml streptomomicina (todos provenientes de Gibco, Grand Island, NY).

A coleta de células da medula óssea dos ratos doadores, foi obtida através de punção das epífises ósseas com agulha número 22 e lavagem dos canais medulares por injeção de 10 ml do mesmo meio de cultura celular.

Após a extração das células, a suspensão foi filtrada em malha de nylon estéril (poro de 180µc) e centrifugada a 1.200 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuspensão com 3 ml do meio de cultura acima descrito. O teste da exclusão pelo azul de Trypan foi usado para acessar a viabilidade celular (considerada satisfatória quando maior de 95%) e proceder a contagem das células por citometria óptica. A quantidade em ml da suspensão (X) necessária para atingir o número desejado de células foi dado pela fórmula:

$$X = \frac{250.000.000 \times 3}{n^{\circ} \text{ de células contadas.}}$$

Após o cálculo, $2,5 \times 10^8$ de células em suspensão foram injetadas na veia peniana dos ratos Lewis receptores, imediatamente depois da cirurgia do transplante ortotópico de intestino delgado.

3.6. Imunossupressão e Antibioticoterapia Profilática:

Todos os ratos transplantados receberam injeção intramuscular de 1.0 mg/Kg/dia de FK 506, dissolvido em HCO-60 e manitol (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan), diariamente a partir do dia dos transplantes, durante as duas primeiras semanas e, a seguir, apenas uma aplicação semanal da mesma dose até o final do experimento.

Todos os ratos também receberam por três dias consecutivos ao transplante injeções intramusculares de 1mg/Kg/dia de cefoxitina sódica (Merck Sharp Dohme), dissolvida em solução fisiológica (Abbott).

3.7. Avaliação Clínica da DEVH

Todos os ratos transplantados tiveram seu peso corpóreo mensurado pelo menos duas vezes por semana. Foram também observados em relação a presença de sinais clínicos sugestivos de DEVH ("rash" cutâneo, hiperqueratose, perda de pelagem, diarreia e diminuição do peso corpóreo), ou rejeição do enxerto (diarreia intensa, distensão abdominal, perda de peso e peritonite). A evolução clínica da DEVH foi quantificada de acordo com a seguinte graduação:

0: Ausência de alteração clínica.

+: Hiperemia cutânea discreta e diminuição do corpóreo menor do que 10 %.

++: Hiperemia cutânea moderada, diminuição do peso corpóreo entre 10 - 20% e presença de perda de pelagem ou hiperqueratose.

+++: Hiperemia cutânea intensa, diminuição do peso corpóreo maior que 20% e presença de perda de pelagem e hiperqueratose.

3.8. Final do Experimento.

O sacrifício do animal receptor ocorreu no DPO pré-determinado para o respectivo grupo experimental ou de acordo com a precariedade do seu estado de saúde (DEVH grau III e perda de peso corpóreo > 30%).

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados por via inalatória com Metoxyflurane (Abbott). O sacrifício foi realizado em capelas de fluxo laminar utilizando-se material microcirúrgico, paramentação e campos estéreis. As amostras de lifonodos cervicais, língua e segmento intestinal do enxerto e do receptor, foram colhidas previamente para a prática da transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) de acordo com o método descrito a seguir.

Após a anti-sepsia com Betadine de toda a região ventral, os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal e submetidos a incisão cervical transversa. Os lifonodos cervicais foram evidenciados e ressecados após ligadura de seu pedículo vascular. Dos lifonodos obtidos, três foram utilizados para RT-PCR e outros dois lifonodos foram designados para análise histopatológica.

A necrópsia prosseguiu com laparotomia mediana xifo-púbica. Inspeccionou-se os órgãos da cavidade abdominal com especial atenção para o tubo digestivo. Identificou-se a anastomose ileo-ileal. Amostras de três centímetros (cm) do íleo enxertado foram retirados para RT-PCR, a partir de um cm proximal a linha de anastomose e outros três cm do mesmo segmento intestinal para análise histopatológica. Foram também colhidas amostras de três cm do intestino delgado do receptor a partir de um cm distal a linha de anastomose, e outros três cm do mesmo segmento para exame histopatológico. Os segmentos intestinais destinados a PCR foram lavados com 100 ml de água destilada, depositados em tubos de plástico estéreis de 1,5ml e imersos em nitrogênio líquido.

A seguir, a língua foi colhida por meio de secção em sua raiz, e lavada com 30 ml de água destilada. A partir da base da ressecção da língua, meio cm foi retirado para PCR e o restante destinado a avaliação histopatológica. Todas as amostras colhidas para PCR foram depositadas em tubos de plástico eppendorf estéreis de 1,5 ml, imersos em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para congelador com temperatura constante de -70°C . As amostras para estudo histopatológico foram imersas em frascos de 10 ml contendo 5 ml de formol a 10%. Os ratos foram sacrificados por exsanguinação.

3.9. Análise da expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de diferentes citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10), por meio da RT-PCR

O método utilizado seguiu especificações já descritas e bem estabelecidas (18, 53, 57, 111) e constou das seguintes etapas.

3.9.1 Extração do mRNA.

A extração do mRNA foi feita de acordo com a técnica de Chomczynski & Sacchi (18). Amostras do intestino delgado do receptor e doador (íleo distal), linfonodos cervicais e língua estocados a -70°C foram depositados em 2 ml de RNazol (Biotecx Laboratories Houston TX), pulverizados e homogeneizados em aparelho homogeneizador de tecidos (92/Polytron PTA 105, VWR Scientific). Um décimo de volume de clorofórmio (Abbott) foi adicionado a solução que, agitada vigorosamente por 15 segundos em vortex (VWR Scientific), foi mantida por 15 minutos em geladeira de isopor contendo gelo para lise dos tecidos. A seguir a solução foi centrifugada (Beckman, GS-6R) a 12000 rotações por minuto (rpm) por 15 min. a 4°C . A camada aquosa sobrenadante contendo m-RNA, foi isolada do precipitado escuro (contendo fenol, clorofórmio e restos teciduais) e transferida para tubo de plásticos estéreis de 1.5 ml. Esta solução foi misturada a isoproterenol (Abbot) em quantidade 2 vezes maior ao da solução aquosa, por toda noite, e mantida à -20°C para precipitação do RNA. A seguir, a solução de RNA + isoproterenol foi centrifugada a 12000 rpm por 30 min. a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (m-RNA) foi lavado (ressuspenso e centrifugado a 12000 rpm por 10 min. a 4°C) 2 vezes com 0.8 ml de etanol a 75%. O total de mRNA isolado foi enxuto em centrífuga a vácuo (Speed Vac SC100, Savant) e ressuspenso com 0.5 ml de água livre de RNA (DEP-C H₂O). A quantidade de mRNA foi determinada em leitura por

espectrofotômetro (Utrospec II, LKB-Biochrom), que forneceu a concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ da solução contendo o m-RNA isolado.

3.9.2. Transcrição reversa.

Cinco microgramas (μg) do mRNA total isolado foram utilizados para a síntese da sequência do primeiro cordão do ácido desoxiribonucleico complementar (cDNA) sintetizado. Assim, o volume correspondente a 5 μg do mRNA total isolado foi enxuto em centrífuga a vácuo (Speed Vac SC100, Savant). Ao precipitado de RNA obtido, foi adicionado 3 microlitros (μl) de DEP-C H₂O para a diluição do mRNA e a solução depositada em isopor contendo gelo por 15 min. A seguir adicionou-se 1ml da sonda de DNA ("primer") (oligo dT - Boehringer Mannheim) e desnaturou-se a solução a 65⁰ C por cinco min. para a síntese do primeiro cordão de DNA. A seguir resfriou-se imediatamente a solução em gelo por 1 min. para evitar a formação de laço ou superposição do DNA formado. A esta solução acresceu-se 6ml da mistura magna (reagentes) com a seguinte composição: um μl (250 mM) Tris-HCl, 1 μl (375mM) KCl, 1 μl (10 mM) dNTP (Boehringer Mannheim), 1 μl do inibidor da RNase da placenta humana (Gibco BRL, Bethesda MD), 1 μl (20 U/ml) de MMLVRT (mouse maloney leukemia vírus reverse transcriptase) (Gibco BRL) e 1 μl (50 mM) de DTT (Gibco BRL), para que se procede-se a transcrição do cDNA.

Os 10 μl finais de solução foram incubados à 37⁰ C por 60 min., para favorecer a transcrição do cDNA. No final do período de incubação, foi adicionado 10 μl de DEP-C H₂O para fazer uma diluição final de 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esta solução final de cDNA foi mantida a -20⁰ C até a realização da PCR.

3.9.3 Reação em cadeia da polimerase [polimerase chain reaction (PCR)].

Quinhentos nanogramas (ng) contidos em 2ml da solução de cDNA transcrito foi usado como molde (template) e os "primers" (pares de oligonucleotídeos usados como sonda específicas para cada citocina e β -actina) foram preparados para cada gen, no Laboratório de síntese de DNA do Centro Médico da Universidade de Pittsburgh, usando seqüências específicas (anexo 1). A terminação 5 do cordão senso do "primer", foi marcado com o fósforo radioativo (³²P) utilizando o catalisador T4 polinucleotídeo kinase (USB, Cleveland OH) e gamma ³²P-dATP (Sigma) e purificado através de sua passagem em coluna de Sephadex G-50 (Sigma). Ao primer senso radiomarcado foi adicionado o primer senso e antisenso não marcado para fazer a mistura de "primer" ("primer" mix.). Amplificação do cDNA específico para as citocinas ou β -actina, foi feita utilizando-se 2 μl do "primer" específico de cada citocina, 2 μl da solução de cDNA e 46 μl de reagentes nas seguintes condições: 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.25 mM dNTP (Boehringer Mannheim), e 1.25 U Taq Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). , 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nuclease-free BSA, 2 mM dNTP, 0.5 mCi (g-³²P) dATP por reação, 0.625 unidades Amplitaq por reação; (Perkin-Elmer, Emeryville, CA)].

Amplificação de 30 ciclos foi realizada por ciclador térmico Perkin-Emel (Model 9600), sendo que cada ciclo representou as seguintes condições de temperatura: desnaturação a 94°C por um minuto, agrupamento (annealing) a 59°C por 2 min, e extensão a 72°C por três minutos. PCR para cada gen estudado foi realizado simultaneamente, e com os mesmos reagentes para assegurar condições bioquímicas similares. O produto final da PCR para cada amostra foi separado em gel eletroforético vertical de poliacrilamida a 6% , enxuto, fotografado, autoradiografado e quantificado em cpm através de leitura em BetaScope radioanalítico. O nível de β -actina em cada amostra foi analisado para controle de sua qualidade interna e os resultados foram expressos como a percentagem da razão de citocina/ β -actina.

Controle positivo foi obtido de esplenócitos de rato LEW normal, estimulados em cultura por 18 horas com 10 mg de PHA (Gibco BRL), 10 μ g/ μ l de Concanavalina A (Sigma), e IL-2 (20 unidades/ μ l) para ativação destas células e conseqüente liberação de citocinas. Após colheita dos esplenócitos ativados, eles foram analisadas por PCR, de acordo com o mesmo método acima descrito, para pesquisa da expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, onde, neste material, verificou-se forte expressão de todas estas citocinas.

O controle negativo foi obtido usando o mesmo método acima descrito, porém substituindo os 2 μ l da amostra de cDNA (template) por água.

3.10. Citometria de fluxo.

Para a análise do quimerismo utilizamos a citometria de fluxo, de acordo com especificações já bem definidas (2, 44, 73, 109, 119)

Oitenta μ l de sangue periférico colhido da veia da cauda dos animais, foram misturados a 7 ml de solução para lise de glóbulos vermelhos (red cells lysing buffer - Sigma) por 15 minutos e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. a 4°C. Após isto, colheu-se o precipitado que correspondeu aos glóbulos brancos. Estes foram lavados (ressuspenso e centrifugado a 12000 rpm por 3 min. a 4°C) com solução de citometria de fluxo [500 ml HBSS (Hank's balanced salt solution) + 5g albumina de soro bovino + 0.5mg sodium azide todos da Gibco Inc.] por três vezes, e incubado por 30 min. a 4°C com os anticorpos primários MN4-91-6 em diluição de 1:500 (anti-ACI, Serotec, UK) e OX-19 a LEW em diluição de 1:400 (anti LEW, Serotec, UK).

A seguir, as células foram novamente lavadas 3 vezes com solução de citometria de fluxo e incubadas por 30 min. a 4°C com anticorpo marcado com fluoresceína SaPE em diluição de 1:300 (anti-ACI, Serotec, UK) e a-MIgGFz em diluição de 1:100 (anti-LEW, Serotec, UK) por 30 min. a 4°C, lavado mais 3 vezes, fixado em paraformaldeído, e analisado em um FACScan II (Becton Dickison, Sunnyvale, Calif.).

Figura 1.

Histograma mostrando células de LEW normal em janela 1 e de ACI normal em janela 3 (Figuras 1.1 e 1.2). Notar em LEW quimeras dos grupos E1 e E2, importante quantidade de células na janela 3 correspondente a janela de ACI (Figuras 1.3 e 1.4).

Figura 1.1- LEW normal**Figura 1.2-** ACI normal**Figura 1.3-** LEW E1 no DPO 95 com 24.4% de células de ACI**Figura 1.4-** LEW E2 no DPO 65 com 16.6% de células de ACI

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se LYSIS II software (Becton Dickison), onde os valores foram calculados como percentagem de células que eram marcadas com anticorpo anti-ACI (MN4-91-6 e SaPE) verificado na janela F3, ou anti-LEW (OX-19 aLEW e a-MIgGFz, Serotec, UK) verificado na janela F1 (Figura 1). Para cada reação de ratos do grupo experimento, foi utilizado 80 µl de sangue periférico de animais ACI e LEW normais como controle onde, nesta reação, valores menores de 99% para a pureza das células dos controles era considerado contaminação, invalidando o exame.

3.11. Reação mista dos linfócitos.

A reação mista dos linfócitos é método bastante utilizado na avaliação da reatividade celular *in vitro* no transplante de órgãos (1, 68, 73, 76, 109). Os linfonodos foram obtidos de quatro animais do grupo E2, doze ratos LEW normais, oito ratos ACI normais e oito ratos PVG normais conforme descrito no item 3.8. Para a colheita dos linfócitos do parênquima do linfonodo, procedeu-se o seu corte em finas fatias e lavagem cuidadosa do tecido por meio de injeção de 10 ml de meio de cultura [RPMI 1640 suplementado com 25 mM L-Glutamina, penicilina (50 U/ml), streptomycina (50 mg/ml), e 50% de soro inativado de rato]. Os linfócitos de cada animal assim obtido, foram contados por meio de citometria óptica convencional e classificados como estimulados e estimuladores em reação mista dos linfócitos unidirecional (estimuladores → estimulados). Os linfócitos estimulados foram provenientes de quatro animais do grupo E2 e de quatro ratos LEW normais (controle isogênico). Os linfócitos estimuladores foram provenientes de quatro animais LEW normais, quatro animais ACI normais e quatro animais PVG normais que receberam irradiação de 2000 rads de raios gamma (Gammacell 1000 E. Lite) por 4 min. e 38 segundos. Esta irradiação inativa a capacidade de proliferação de linfócitos, tornando-os apenas estimuladores de resposta imune, quando misturados em meio de cultura a linfócitos de cepas diferentes. O total de 175000 linfócitos estimulados de cada animal do grupo E2 ou controle foram misturados a 300000 linfócitos estimuladores de ratos LEW (isogênico), ACI (alogênico da mesma cepa do doador) e PVG (alogênico terceira parte) em placas estéreis (Falcon 3077) contendo 0.2 ml do meio de cultura acima descrito, e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂, por 5 dias (Figura 2). O grupo de linfócitos estimulados de cada animal (E2 ou LEW), foram também cultivados, sob as mesmas condições acima expostas, apenas com meio de cultura, sem células estimuladoras, como controle negativo. Um mCi de Timidina triciada (³[H]-timidina), foi adicionado nas placas de cultura 16 Hs antes do tempo final de cultura dos linfócitos. Esta substância tem a capacidade de se incorporar ao DNA das células em divisão (estimuladas) funcionando como excelente marcador de ativação e proliferação linfocitária. As células foram observadas diariamente, até o 5º dia de cultura. Após o período final de incubação, as células foram colhidas e a emissão de ³[H]-thymidine foi determinada por cintilação líquida (Liquid Scintillation Counter, Wallac 1205-Betaplete) fornecendo resultados em cpm.

Figura 2

Reação Mista dos Linfócitos - Representação Esquemática

3.12. Estudo Histopatológico

Os diferentes tecidos obtidos por ocasião do sacrifício, fixados em formol a 10%, foram processados e incluídos em parafina e corados pelo método de H & E para análise histológica, sem conhecimento prévio do grupo analisado.

O estudo histopatológico da DEVH foi realizado na divisão de Patologia em Transplante do Departamento de Patologia da Universidade de Pittsburgh, baseado em especificações já estabelecidas (57, 65, 91). A DEVH no órgão analisado foi quantificada em três graus (I- discreta, II- moderada e III- grave) como segue:

3.12.1. Língua:

Grau I - Infiltrado linfocitário discreto de mucosa, edema intercelular, degeneração e necrose da mucosa.

Grau II - Infiltrado linfocitário maciço de mucosa, necrose eosinofílica, espongiose, disqueratose e apoptose.

Grau III - Necrose confluyente com separação de mucosa e sub mucosa.

3.12.2. Linfonodo cervical:

Grau I - hiper celularidade, mas com arquitetura preservada do parênquima.

Grau II - Presença de população celular com reatividade anormal e depleção celular moderada.

Grau III - Fibrose, desarranjo arquitetural e intensa depleção celular

3.12.3. Intestino delgado:

Grau I - Infiltrado linfocitário discreto e apoptose menor que 25% do epitélio

Grau II - Atrofia de vilosidade, múltiplas criptites (+ de três por campo) e apoptose maior de 25% do epitélio.

Grau III - ausência de vilosidade (mucosa plana), presença de ulcerações e necrose.

3.13. Análise Estatística.

A evolução do peso corpóreo para cada grupo foi analisada pelo teste de Friedman com pós teste de Miller Dunn. Para comparar a variação de peso entre os grupos de estudo (E1 e E2) e os seus respectivos controles (C1 e C2), aplicamos o teste de Mann Whitney. A evolução do grau de lesão foi analisada pelo teste do qui quadrado. A variação do número da percentagem de células do doador no sangue periférico dos animais receptores foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Miller Dunn. Os resultados do PCR para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α foram analisado pelo método de Mann Whitney e regressão linear (r^2). Os resultados da reação mista de linfócitos foram analisados pelo método de Student-Newman-Keuls. Valores $P < 0.05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 *Evolução pós-operatória e autópsia.*

4.1.1. **Peso corpóreo**

A evolução do peso corpóreo foi analisada pela variação da percentagem do peso corpóreo nos animais de cada grupo ao longo do tempo (média e desvio padrão), em relação ao peso inicial e está sumarizada na figura 3 e tabelas 2, 3, 4 e 5 do capítulo de apêndice. Os animais do grupo controle apresentaram evolução sempre ascendente de peso, que se tornou significativa, em relação ao peso inicial, a partir do 91º DPO para os animais do grupo C1 e DPO 77º para o grupo C2. Para ambos os grupos (C1 e C2), a diferença de peso permaneceu progressivamente significativa até o final do experimento. No grupo de estudo, os animais apresentaram inicialmente aumento do peso corpóreo em relação ao peso inicial, sendo que, a significância estatística se iniciou a partir do DPO 63º para o grupo E1 ($p < 0,05$) e no DPO 67º ($p < 0,05$) para o grupo E2. Ocorreu significância máxima no DPO 77º ($p < 0,001$) no grupo E1 e DPO 84º ($p < 0,001$) para o grupo E2. A seguir ocorreu perda progressiva de peso, fazendo com que a significância desaparecesse após o DPO 98º no grupo E1 e DPO 105º no grupo E2. Esta queda de peso se relacionou com o início e aumento da intensidade dos sinais clínicos da DEVH. Para comparar a variação de peso entre os grupos de estudo (E1 e E2) e os seus respectivos controles (C1 e C2), aplicou-se o teste de Mann Whitney em três tempos de pós-operatório: DPO 84º, DPO 120º e DPO 182º. No DPO 84º não houve diferença estatística entre os grupos controle e de estudo. Observamos diferença entre os grupos no DPO 120º ($E1 < C1 = p < 0,05$ e $E2 < C2 = p < 0,05$) e no DPO 182º ($E2 < C2 = p < 0,004$).

4.1.2. **Evolução clínica da DEVH**

Todos os animais do grupo E1 e E2 apresentaram DEVH quando foram sacrificados. Os sintomas se iniciaram no DPO 100.3 ± 14.5 nos animais do grupo E1 e no DPO 94.5 ± 9.9 nos do grupo E2. A evolução da doença foi progressiva (figura 4), de tal forma que, por ocasião do sacrifício, quatro animais do grupo E1 (POD 120º) apresentaram DEVH grau I e dois animais grau II. No grupo E2, todos os animais apresentaram grau III de DEVH (figura 5, e tabelas 6 e 7 do capítulo de apêndice). A análise da evolução do grau de DEVH nos animais com longa sobrevivência (grupo E2) pelo método do qui quadrado, revelou diferença estatística na progressão dos sinais clínicos ao longo do tempo que se iniciou no POD 112º ($p < 0,012$) continuando significativa até o final do experimento. Clinicamente, todos os animais do grupo E2 ao cabo do experimento apresentavam-se com DEVH grave (grau III), observando-se, além dos sintomas já citados, distúrbios do comportamento (rodando sem parar), alterações motoras (marcha descoordenada) e postura corcunda. No grupo controle (grupo C1 e C2), todos os animais tiveram evolução normal sem nenhuma evidência de doença.

4.1.3. Autópsia

Os achados de autópsia evidenciaram, para todos os grupos do presente trabalho, cavidade abdominal com aderências variando de discretas a moderadas, enxertos de intestino delgado e restante do tubo digestivo do animal receptor de características normais. Nos animais do grupo experimental (E1 e E2), observou-se esplenomegalia e aumento dos linfonodos cervicais e redução do volume do timo. Os demais órgãos tinham aparência normal.

4.2. Citometria de fluxo

Analisou-se por meio da citometria de fluxo a variação do número da percentagem de células do doador no sangue periférico dos animais do grupo E1 e E2 em diferentes dias de avaliação pós-operatória (30°, 65°, 95°, 120°, 160° e 200°) pelo método de Kruskal-Wallis com pós teste de Miller Dunn. Os resultados estão apresentados de forma gráfica nas figuras 1, 6 e 7 e nas tabelas 8 e 9 do capítulo de apêndice.

Grupo E1 - Verificou-se aumento progressivo da percentagem de células do doador no sangue periférico, significativo entre os tempos 30° e 95° DPO ($p < 0.001$) como se observa na figura 6.

Grupo E2 - Observou-se, conforme mostra a figura 4, aumento significativamente progressivo da percentagem de células do doador no sangue periférico destes animais como se observa na figura 7.

Quando se comparou os dois grupos experimentais (E1 X E2) quanto a percentagem de células do doador no sangue periférico destes animais, nos mesmos dias de pós-operatório (30°, 65° e 95°), pelo método estatístico de Kruskal-Wallis com pós teste de Miller Dunn, não se encontrou diferença estatisticamente significativa.

4.3. Resultados da expressão genética (mRNA) da IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ analisada por meio da RT-PCR.

RT-PCR foi realizada nos animais do grupo E1 e C1, em língua, linfonodos cervicais e intestino delgado do animal doador e receptor para determinação da IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α . Os resultados obtidos foram analisados pelo método de Mann Whitney, encontram-se nas figuras 8 a 11 e nas tabelas 10 a 13 do capítulo de apêndice. Na língua, no grupo experimento (E1), houve aumento significativo da expressão de IL-2, IL-6, IL10, IFN- γ and TNF- α quando comparado ao grupo controle (C1) como se vê nas figura 8. Nos linfonodos cervicais, só níveis de IL-4, IL-6, IL10, IFN- γ e TNF- α também foram significativamente maiores que os dos respectivos controles (figuras 9). Nas amostras de intestino delgado do enxerto e do receptor, não se verificou alteração da produção das diferentes citocinas em quaisquer dos grupos analisados pelo mesmo método (figuras 10 e 11). Os níveis de produção de IL-2 e IL-4 se mantiveram sempre baixos apesar da significância estatística de IL2 em língua e IL-4 em linfonodos cervicais, quando comparados aos seus respectivos controles.

4.4. Resultados da Reação Mista dos Linfócitos

Os resultados da reação mista dos linfócitos foram obtidos pela contagem em cpm das células linfóides estimuladas marcadas com $^3\text{[H]}$ -timidina após 5 dias de cultura e se encontram nas figuras 12 e 13 e na tabela 14 do capítulo de apêndice. Quando ratos LEW normais foram estimulados por células de ratos ACI (ACI—>LEW) ou PVG (PVG—>LEW) (estimulação alogênica), a resposta foi intensa, com aumento do número de cpm significativamente maior quando comparado a estimulação feita por ratos LEW (LEW—>LEW-isogênica) ou quando estas células foram mantidas apenas em meio de cultura (MEIO—>LEW). Quando se comparou a estimulação provocada por PVG—>LEW X ACI—>LEW ou LEW—>LEW X MEIO—>LEW não houve diferença estatística (gráfico 11).

Na estimulação de linfócitos do grupo E2, houve resposta discreta do número de cpm, para estimulação isogênica (LEW—>E2), por meio de cultura (MEIO—>E2) e também para a alogênica por ACI (ACI—>E2) que é a mesma cepa de ratos usada como doadores dos enxertos de intestino delgado e medula óssea, não havendo diferença significante entre estes resultados ($p > 0.05$). Por outro lado, quando linfócitos do grupo E2 foram estimuladas com células de ratos PVG (alogênica terceira parte), houve aumento importante do número de cpm, estatisticamente significante quando comparado com as estimulação LEW—>E2 ($p < 0.001$), MEIO—>E2 ($p < 0.001$) ou ACI—>E2 ($p < 0.001$), denotando hiporesponsividade específica (tolerâncias imunológica) dos animais do grupo E2 as células de ACI (figura 12). Quando comparamos os dois grupos entre eles (LEW normal X E2) de acordo com as diferentes estimuladores, observamos diferença estatística apenas na estimulação por ACI ($p < 0.05$), denotando baixa reação alogênica das células dos animais quimeras do grupo E2 as células estimuladoras de ACI.

4.5. Resultados da Análise Histopatológica

Na análise histopatológica de ambos os segmentos intestinais (enxerto e receptor), constatou-se ausência de sinais de rejeição ou DEVH em todas as amostras estudadas. Nos linfonodos cervicais, observou-se predominância de lesão grau II nos animais do grupo E1 (figura 14a) e grau III nos animais do grupo E2. Na língua, observou-se lesão grau II nos animais do grupo E1 (Figura 14b) e grau III nos do grupo E2.

Nos animais do grupo controle, não foram evidenciadas quaisquer alterações histopatológicas nos referidos tecidos analisados.

Figura 3

Análise da variação de peso corpóreo nos grupos C2 e E2

Figura 4

Análise da evolução clínica da DEVH nos grupos E1 e E2

Figura 5

Aspectos clínicos da DEVH grau III. Notar a perda de pêlo, hiperemia cutânea (Figura 5.1) e hiperqueratose de pata (Figura 5.2)

Figura 5.1

Figura 5.2

Figura 6

Representação Gráfica da Percentagem de Células do Doador (ACI) no Sangue Periférico de Ratos do Grupo E1

* DPO 30 < 95 = $p < 0.001$

Figura 7

Representação Gráfica da Percentagem de Células do Doador (ACI) no Sangue Periférico de Ratos do Grupo E2

Figura 8

Figura 9

Figura 10

Citocinas no Intestino do Receptor

Figura 11

Figura 12

Reação Mista de Linfócitos de Ratos Lew Normais

* LEW < ACI = $p < 0.001$; LEW < PVG = $p < 0.001$

@ MEIO < ACI = $p < 0.001$; MEIO < PVG = $p < 0.001$

Figura 13

Reação Mista de Linfócitos em Animais do Grupo E2

* LEW < PVG = $p < 0.001$

@ MEIO < PVG = $p < 0.001$

& ACI < PVG = $p < 0.001$

Figura 14

Microscopia óptica de linfonodo cervical mostrando DEVH grau II, com grande atividade linfocitária e depleção celular (figura 14a, detalhe na seta), e de língua mostrando DEVH grau II, com infiltrado linfocitário maciço de mucosa e sub mucosa (figura 14b).

Figura 14a **Figura 14b**

5. DISCUSSÃO.

5.1. *Do modelo experimental e da DEVH.*

Este estudo originou-se de recentes pesquisas feitas no Centro Médico da Universidade de Pittsburgh. Este centro estuda intensamente os efeitos do quimerismo que ocorre após o transplante, objetivando a descoberta de modelos de modulação imunológica para a indução de tolerância e o estudo da DEVH (25, 84, 96-101). O quimerismo tem sido estudado também por vários outros grupos, aparecendo como forma promissora de modulação imunológica para indução da tolerância, e está sempre associado ao aparecimento da DEVH (7, 11, 68, 76, 106, 113).

Com o maior controle da rejeição do órgão transplantado promovido pelo fenômeno da tolerância, se amplia a extensão da aplicabilidade deste como método terapêutico, viabilizando transplantes imunologicamente difíceis, como o de intestino delgado, medula óssea e pulmão (56, 76, 78, 106). Poderia também facilitar a realização de transplante interespécies, o xenotransplante, que seria um importante avanço para a solução do problema da carência de doadores cadavéricos (56, 78).

Um dos modelos de tentativa de indução da tolerância mais estudado, é o que promove o aumento do quimerismo com o transplante combinado de medula óssea e do órgão sólido. Este procedimento se baseia em observações experimentais e clínicas que demonstraram que a persistência de células do doador no organismo hospedeiro induz nestes uma diminuição ou ausência de resposta imunológica específica contra os antígenos do doador (7, 32, 73, 96-101).

O presente estudo, fez a técnica do aumento do quimerismo no transplante de intestino delgado, entre cepas de ratos alogênicos com MHC fortemente diferentes, e em que pese termos promovido tolerância ao intestino transplantado, provocamos DEVH uniforme em 100% dos animais. Assim, este modelo experimental serve de alerta aos protocolos clínicos que fazem uso do aumento do quimerismo (7, 32), para a possibilidade de indução de DEVH. Fornece ainda a oportunidade de maiores estudos nesta área, principalmente no que concerne ao controle desta complicação (44).

Para a realização do presente trabalho utilizamos ratos isogênicos, que têm vantagens sob outros animais de experimentação, pelo fato de necessitarem de pouco espaço para sua manutenção, fácil manipulação, tamanho razoável para microcirurgia e principalmente porque eles permitem realizar modelos experimentais, com fenômenos imunológicos semelhantes aos encontrados nos transplantes clínicos, reproduzindo-os de forma homogênea (108, 109).

Deste modo, vários estudos se ocupam em padronizar modelos de TID em ratos, por meio de diversas combinações entre diferentes cepas isogênicas doadoras e receptoras. Estas pesquisas descreveram modelos estáveis que se prestam ao estudo da rejeição, da DEVH, da tolerância imunológica e da ação de novas drogas imunossupressoras (21, 22, 28, 44, 50, 60, 69, 70, 72-74, 76, 92, 103, 108, 109).

A utilização no presente trabalho da combinação entre as cepas de ratos ACI doador, LEW receptor, se baseou em recente experimento onde realizamos TID entre ratos isogênicos da cepa LEW, ACI, PVG e BN, como doadores e receptores em 16 diferentes combinações (108, 109). A diferença entre a intensidade dos fenômenos imunológicos das diversas combinações de TID, dependeu do grau de incompatibilidade imunológica entre as cepas combinadas. Esta variou de ausente, nos transplantes entre ratos isogênicos onde os ratos sobrevivem indefinidamente sem imunossupressão, até incompatibilidade total alogênica, como no caso da combinação do presente experimento. Portanto, na combinação ACI doador - LEW receptor, os animais receptores sem imunossupressão morreram por rejeição aguda entre os dias de pós-operatório (DPO) 5 e 6, e sob imunossupressão com FK-506 os receptores morreram entre os DPO 85 e 144 por rejeição crônica (108, 109).

A grande reação imunológica obtida no TID entre as cepas ACI doador e LEW receptor, motivou optarmos por realizar a tentativa de indução de tolerância imunológica nesta combinação de animais.

Os modelos experimentais pioneiros de DEVH datam de 1957 e foram descritos por Billingham e Brent (9) e Simonsen (95). Estes autores mostraram que infusão de suspensão de linfócitos provenientes de baço (esplenócitos), entre camundongos de diferentes cepas isogênicas, promoviam o enxertamento destas células culminando com a DEVH, nesta época conhecida como *runt disease*. Estas observações seguiram os modelos de tolerância imunológica propostos pelo grupo de Medawar (11, 13), que foram os pioneiros nas pesquisas de infusão de células vivas para indução de hipo-responsividade específica.

Dois anos mais tarde, novamente Billingham e Brent (12) mostraram que o transplante de células de diferentes órgãos linfóides centrais como medula óssea, baço e linfonodos, tinham a mesma capacidade de indução de tolerância imunológica. Contudo a medula óssea provocou menos DEVH do que os outros órgãos imunológicos citados. Estas observações nortearam a utilização da medula óssea, para facilitar a aceitação de órgão alogênico neste trabalho e em outros protocolos experimentais e clínicos.

Mais recentemente, Markus e cols. (65), utilizaram mesma combinação alogênica da presente pesquisa para indução de DEVH, por meio de transplante de 60 milhões de células da medula óssea e 30 milhões de células de esplenócitos de ratos ACI, em ratos Lewis irradiados letalmente duas horas antes do transplante. Sem imunossupressão estes ratos apresentavam DEVH fatal, com morte em média no 21 DPO.

Ainda no trabalho acima descrito(65), sete outros grupos de ratos que usaram diferentes esquemas de imunossupressão com ciclosporina A e FK-506, apresentaram aumento significativo da sobrevida em relação aos animais sem imunossupressão. Contudo todos morreram também de DEVH aguda, poucos dias após o parada do uso de imunossupressores. Apenas 3 grupos os quais fizeram uso de altas doses de FK-506, tiveram sobrevida maior de 60 dias, e destes só 3 ratos atingiram o DPO 100, os outros também morreram por DEVH aguda.

Na análise do quimerismo verificado no sangue periférico por citometria de fluxo, quatro semanas após a infusão de linfócitos, Markus e cols. (65) notaram que a presença

de células do doador no sangue periférico do receptor, foi sempre maior do que 95% em todos os animais testados. Este aumento rápido e intenso da percentagem de células de ratos doadores no sangue periférico de ratos receptores justificam a evolução para DEVH aguda dos ratos deste modelo experimental.

Em nosso experimento, apesar de termos utilizado infusão de maior número de células da medula óssea, e da transferência de grande população de células imunocompetentes, presente principalmente nos linfonodos intestinais, não observamos quadros agudos de DEVH, e o quimerismo por nós observado não foi tão precoce e intenso quanto o observado por Markus e cols. (65). Esta diferença na evolução do quimerismo e da forma de evolução da DEVH, certamente se deveu ao fato de não termos realizado a ablação das células imunocompetentes do receptor por radioterapia, e reconstituição destas com células do doador. Nesta situação os animais transformam-se em quimeras totais, ou seja, animais com medula óssea totalmente recomposta por células do receptor, o que provoca nestes animais grande suscetibilidade a infecção e a DEVH (78, 118).

Por outro lado, nossos animais se comportaram como animais quimeras mistos, ou seja, animais com células da medula óssea provenientes de animais receptores e doadores. Este tipo de quimerismo está mais relacionado ao fenômeno de tolerância imunológica, e promove nestes animais maior resistência a DEVH, principalmente de carácter agudo (78, 118).

No estudo da DEVH após transplante de órgão sólido, modelos experimentais baseados no TID em rato destacam-se como os mais utilizados.

Monchick & Russel (69), no seu clássico trabalho de descrição da técnica microcirúrgica do TID em ratos, também criaram um modelo para o estudo de DEVH que ainda hoje é muito utilizado. Estes autores induziram a DEVH por meio de TID semialogênico realizado entre animal isogênico da cepa LEW como doador, para receptores descendentes do cruzamento entre cepas LEW e BN, chamados de F1 híbrido. Nesta situação, os animais receptores descendentes são incapazes de rejeitar o intestino transplantado, por compartilharem com os doadores características genéticas afins, porém sofrem ataque alogênico do forte componente imunológico presente no enxerto de intestino, proveniente da cepa LEW.

Segundo Monchick e Russel (69), todos os animais receptores apresentaram morte por DEVH entre os dias de pós-operatório (DPO) 12 a 20 (média 16.9 ± 1.0). O princípio de cruzamento parental F1 para a indução de DEVH, também se manifestou com o uso de outras combinações de ratos isogênicos, com resultados muito semelhantes ao acima descrito (80, 103).

Outra forma muito utilizada de indução de DEVH após transplante de órgão sólido, é a combinação de cepas de ratos LEW (25, 28, 73, 74, 108, 109), PVG (108, 109) ou WAG (21, 22) como doadores e BN como receptor de TID, sob diferentes esquemas de imunossupressão.

Neste modelo, os animais BN apresentaram morte precoce decorrente de DEVH aguda, devido a cepa de ratos BN apresentarem ausência ou alteração da cadeia invariante

do complexo maior, de histocompatibilidade classe II (MHC classe II). Nesta situação, os ratos BN têm dificuldade em apresentar os antígenos exógenos presentes no enxerto intestinal das cepas LEW, PVG ou WAG pelas células apresentadoras de antígenos de seu sistema imunológico, produzindo distúrbio na ativação dos linfócitos T CD4⁺ (13, 72-74, 109, 110). Em consequência disso, os animais BN não promovem reação imunológica contra o intestino transplantado, porém ficam sujeitos ao ataque do componente imunológico presente neste enxerto alogênico.

Portanto, analisando a indução experimental da DEVH após transplante de órgão sólido, podemos observar que os modelos atualmente disponíveis são artificialmente baseados no fator unidirecional da resposta imunológica, onde o componente imunológico do enxerto ataca o organismo receptor alogênico, que é incapaz de formular resposta imunológica efetiva contra este enxerto. A decorrência é uma DEVH de caracter agudo, fulminante, com a morte precoce destes animais assemelhando-se à verificada após o transplante alogênico de medula óssea experimental (5, 17, 65), ou clínico (34, 38).

Os modelos atualmente disponíveis, pecam por não reproduzir com fidelidade a fisiopatologia da DEVH após transplante de órgão sólido (TOS). Na DEVH pós TOS, o receptor possui componente imunológico íntegro ou pouco comprometido, o que favorece a ativação bidirecional das células imunológicas do doador e do receptor no pós transplante. Por este motivo a DEVH pós TOS quando presente, tem evolução de caracter crônico, gradual e mais lenta (14, 54, 85, 86).

O modelo experimental do presente trabalho, cursou com DEVH de repetição homogênea e estável em 100% dos animais. O aparecimento dos sintomas clínicos e das alterações histopatológicas da DEVH, tiveram evolução progressiva e uniforme, levando todos animais ao êxito letal após 6 meses de transplante e 2 meses de DEVH. Assim pode-se constatar que o modelo proposto na presente pesquisa, representa com maior propriedade a DEVH observada na evolução de TOS clínicos (14, 54, 85, 86).

No presente modelo de DEVH, observou-se íntima relação da evolução clínica desta doença, com o aumento lento e progressivo de células imunocompetentes do animal doador no sangue periférico do receptor ao longo do tempo. Assim, quando as células do doador somavam-se cerca de 20% no sangue periférico do receptor, ocorria o início da sintomatologia clínica da DEVH, e quando o número de células do doador atingiam 35%, ocorriam os sintomas graves da doença. Este comportamento poderá ser útil para avaliação de planejamentos terapêuticos que visem a redução da porcentagem de células circulantes do doador, procurando manter a estabilidade do estado quimérico em níveis inferiores a 10% para facilitar a indução de tolerância, sem perigo de provocar a DEVH.

Para análise da evolução histopatológica e imunológica da DEVH ao longo do tempo, escolhemos dois tempos de sacrifício. O sacrifício no DPO 120 correspondeu a fase inicial da doença. O estudo da liberação das citocinas neste período, buscou identificar seu papel na reação imunológica, e auxiliar o planejamento de futuros protocolos de tratamento da DEVH baseado em terapia genética, com antagonismo das citocinas responsáveis por esta doença (52, 66, 82, 104, 105).

O sacrifício no estágio final da DEVH, possibilitou estudarmos além do padrão das lesões histopatológicas, o estudo da tolerância imunológica e sua relação com a DEVH.

Neste período observamos que juntamente a DEVH grave, os receptores LEW com longa sobrevida (grupo E1), apresentaram tolerância imunológica a estimulação por células imunocompetentes da cepa doadora (ACI) verificada pela reação mista dos linfócitos.

Evidências de tolerância neste modelo também foram verificadas por ausência de qualquer alteração histopatológica do enxerto de intestino, e pelo perfil da liberação de citocinas (baixa expressão de IL-2 e desenvolvimento das citocinas reguladoras IL-4 e IL-10) relacionado ao fenômeno da tolerância.

Recentemente publicamos os experimentos que originaram a presente linha de pesquisa (119). Neste experimento comparou-se três tipos de transplantes: transplante isolado de medula óssea, transplante isolado de intestino delgado e transplante combinado de intestino delgado e medula óssea, todos utilizando combinação de ratos ACI doador - LEW receptor, com imunossupressão contínua com FK-506 semelhante ao utilizado no presente trabalho.

Após transplante de intestino delgado isolado, encontrou-se células do doador em sangue periférico do animal receptor já na primeira semana de pós operatório (5-10% do total de células), e sintomas de DEVH em 25% dos animais. Com o passar do tempo, o número células do doador diminuiu no sangue periférico e não foi mais encontrado no POD 50. Estes animais rejeitaram o enxerto intestinal (119).

Após o transplante isolado de medula óssea, 80% dos animais receptores apresentaram sinais transitórios de DEVH. Nestes animais a percentagem de células do doador no sangue periférico do receptor foi sempre muito baixa (0.2 - 1.5 %), apesar de terem sido encontradas até no DPO 200. Todos os animais deste grupo tiveram evolução favorável, com longa sobrevida no pós-transplante (119).

No transplante combinado medula óssea -intestino delgado, os resultados clínicos e da celularidade de sangue periférico foram muito semelhantes ao da presente pesquisa. Assim, apesar da presença de DEVH em todos os animais, eles também apresentaram facilitação da tolerância ao enxerto de delgado, tendo em vista a ausência de rejeição do enxerto de intestino, ao contrário do observado quando se realizou o transplante isolado de delgado (119).

Para a caracterização dos fenômenos imunológicos do presente modelo experimental, realizamos três métodos de biologia molecular: citometria de fluxo, RT-PCR e reação mista de linfócitos. Estes métodos têm proporcionado importantes avanços no conhecimento da imunologia pós transplante.

A citometria de fluxo é um método baseado na reação de anticorpos específicos com receptores da membrana celular (2, 44, 73, 109, 119). Estes anticorpos contêm fluoresceína como marcador e vão se ligar a receptores celulares, determinando a identificação e caracterização destas células, além de sua quantificação no material analisado. O instrumento que realiza esta função é chamado de FACS (fluorescence-activated cell sorted), e a quantidade de anticorpo marcado e ligado a cada célula individual em uma população, é mensurado pela passagem das células em suspensão através do fluorímetro. Neste experimento utilizou-se quatro anticorpos específicos, dois anti MHC classe I de rato ACI (MN4-91-6 como anticorpo primário e SaPE como secundário, marcado com fluoresceína) e dois anti MHC classe I de rato LEW (OX-19

α LEW como anticorpo primário e SaPE como secundário, marcado com fluoreceína). Por este método identificou-se a percentagem de células do doador (ACI) no sangue periférico do receptor (LEW) conforme a evolução da DEVH.

No método de RT-PCR, o mRNA foi transcrito para a formação do ácido desoxiribonucleico complementar (cDNA), que foi amplificado por clonagem (18, 53, 57, 111). A RT-PCR se baseia na cópia e amplificação de seqüências específicas de DNA. Para isso é necessário conhecer a seqüência completa de DNA, que deverá ser copiada e a região principal (curta) da seqüência de DNA (short region of DNA), em cada terminação da seqüência completa. A seqüência curta de DNA é sintetizada em laboratório e usada como “primers” (sonda) de oligonucleotídeos específicos. O primeiro primer é idêntico à terminação 5', do cordão senso do DNA a ser copiado e o segundo primer, é idêntico à terminação 3' do cordão anti-senso da seqüência. Então, como DNA de cordão duplo possui cordões anti-paralelos, o segundo primer é também o complemento invertido do cordão senso.

A terminação 5' destes “primers” foram marcadas com fósforo radioativo (^{32}P). A reação de PCR, consta da mistura destes oligonucleotídeos com reagentes contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), que promove a síntese do novo DNA a ser formado. Nesta mistura também está contida a DNA polymerase (enzima catalisadora), que promove a extensão da terminação 3' de cada primer, clonando a parte complementar dos cordões de DNA da amostra.

No PCR, a mistura de DNA e reagentes são submetidos a ciclos de diferentes condições de temperatura. Em cada ciclo há a ampliação do material genético com multiplicação por clonagem progressiva, caracterizando a reação em cadeia. Neste trabalho utilizamos 30 ciclos cada ciclo, com as seguintes especificações: 94°C por 1 min. para promover a desnaturação (afastamento dos cordões de DNA), 59°C por 2 min. para promover o agrupamento do DNA do molde (amostra) ao DNA específico (primer) e 72°C por 3 min., para promover a extensão do DNA específico formando o clone, a partir do molde.

Então, se os cordões duplos de DNA das amostras (molde), possuírem as seqüências do primer específico que se pesquisa (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e β -Actina, no caso da presente pesquisa), estes foram copiados, amplificados e apareciam em gel eletroforético como manchas redondas (do inglês “bands”), na fotografia e autoradiografia. Estas “bands” são quantificadas por BetaScope radioanalítico em contagem por minuto (cpm), de acordo com intensidade da emissão radioativa do ^{32}P , decorrente da amplificação do DNA pesquisado pelo “primer” específico.

A reação mista dos linfócitos (Mixed Lymphocyte Reaction - MLR), é modelo *in vitro* de avaliação da reação imunológica celular e tem sido amplamente utilizado na avaliação imunológica pós-transplante (1, 68, 73, 76, 109). Este método se baseia na cultura de células mononucleares de organismos geneticamente diferentes (neste caso, ratos de diferentes cepas), induzindo sua ativação e proliferação. Neste experimento a reação mista dos linfócitos foi do tipo unidirecional, onde células de animais do grupo de estudo foram utilizadas como estimuladas e mantidas em meio de cultura por cinco dias,

junto com células provenientes de uma das cepas de rato LEW, ACI ou PVG normais, que tinham função de células estimuladoras. As células estimuladoras foram tratadas com 2000 *rads* de irradiação gamma, que torna estas células sem capacidade de proliferação. Assim, na MLR unidirecional, as células irradiadas serviram exclusivamente como estimuladoras e as células não irradiadas, portanto com capacidade de proliferação, serviram como estimuladas. A resposta proliferativa foi mensurada pela incorporação da timidina triciada ($^3\text{[H]}$ -thymidina- Abbott) no DNA durante a replicação celular, e analisada em contagens por minuto (cpm). Portanto, quanto o número de cpm foi alto, representou importante aloreatividade (resposta alogênica) e quando o número de cpm foi baixo, indicou tolerância imunológica ou resposta isogênica.

5.2. Das Citocinas

Na presente pesquisa várias citocinas de diferentes órgãos foram mensuradas, com o objetivo de avaliação da resposta imunológica, nos enxertos de intestino e em órgãos alvos da DEVH.

Sabe-se que as citocinas se mantêm em equilíbrio ao interagir em auto-regulação integrada e qualquer rompimento deste sistema integrado, pode conduzir a um efeito dramático na evolução da resposta imune. Estes mediadores, por efeito tóxico direto, ou por induzir moléculas de adesão, como MHC classe I e II e molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) dentre outras, têm a capacidade de regular a intensidade, duração e eventual efeito da reação imunológica nos transplante de órgãos (4, 6, 19, 30).

As citocinas são produzidas por linfócitos T, macrófagos/monócitos e células do parênquima (células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos fibroblastos, miócitos etc.). Sua principal ação é nestas mesmas células que as produzem, portanto podem ter um papel crucial nas reações imunológicas do transplante intestinal (30, 81).

Enquanto que há poucos anos se imaginava que as citocinas eram apenas geradoras de sinais de ampliação e de diferenciação da fase efetora da resposta imune, recentes pesquisas têm mostrado que as citocinas podem influenciar na regulação da resposta imunológica, e de fato regular as suas próprias ações. Além disso, a ausência de citocinas após uma estimulação alogênica, tem sido sugerido como crítico na indução de tolerância (19, 64).

O comportamento das citocinas na DEVH, é fundamentado em grande número de investigações, usando o transplante isolado de medula óssea. Estes experimentos descrevem a DEVH como sendo uma “tempestade de citocinas” (4-6, 30, 112).

A fisiopatologia desta doença inicia-se com lesão tecidual do hospedeiro, principalmente em órgãos de forte atividade imunológica como intestino, pulmão, fígado, etc., devido a ação de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1), liberadas pelo elevado número de células transplantadas do doador. Esta lesão tecidual provoca também o aumento da expressão do antígeno leucocitário humano (HLA), e de outras moléculas de adesão celular. Os linfócitos T maduros do doador, reconhecem aloantígenos no hospedeiro e se tornam ativados. Ativados, estes linfócitos do doador então se proliferam e secretam mais citocinas (4-6, 30, 112).

Quando a principal resposta da célula T é mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (TH1), ela é dita resposta inflamatória (celulr) e ocorre com intensa produção de interleucinas, principalmente IL-2 e Interferon (IFN) γ . Estas citocinas ativam células mononucleares e macrófagos, tanto do doador quanto do receptor, que resulta na intensa liberação de mais IL-1 e TNF- α . A intensa reação inflamatória resultante deste processo, causa adicional liberação de interleucinas e ativação de intermediadores de nitrogênio como o óxido nítrico, que amplifica a lesão local dos tecidos. O resultado final é uma forma aguda e fulminante de DEVH.

Quando a principal resposta é mediada pelo linfócito T do tipo 2 (TH2), a resposta é dita auxiliar (humoral), com liberação principalmente de IL-4, IL-5 e IL-10. Neste processo o resultado final é uma forma crônica de GVHD com aumento da síntese de IGE e exagerada linfo-proliferação (64, 71, 107). Algumas pesquisas têm relacionado a atuação dos linfócitos TH2 e principalmente da atuação das citocinas IL-4 e IL-10, com o fenômeno da tolerância imunológica (19, 64).

O paradigma da função efetora dos linfócitos TH1 e TH2 como mediadores da resposta imune, é assunto de grande polêmica. Postula-se portanto, que os TH1 estão envolvidos nos processos agudos, liberam principalmente IL-2 e IFN- γ , e pela ação do IFN- γ têm a capacidade de bloquear a proliferação dos TH2. De seu lado os TH2 são linfócitos com características reguladoras, estão relacionados à resposta crônica e seus principais mediadores são a IL-4, que têm a capacidade de inibir o gênese dos TH1 por inibição de seus precursores, e a IL-10 que interfere na ativação dos TH1 pelas células apresentadoras de antígeno, bloqueando assim a liberação de suas citocinas pro-inflamatórias. Portanto estes clones de linfócitos T auxiliares (helper) fariam regulação mútua de sua atividade imunológica (64, 71, 111).

No presente experimento porém, encontramos o aumento da liberação de citocinas produzidas por ambos os clones TH1-TH2, sugerindo uma associação destes clones na evolução da reação imunológica da DEVH, produzida por este modelo experimental. Esta associação TH1-TH2 foi também evidenciada na rejeição de enxertos de coração em camundongos e em alguns modelos de indução de tolerância imunológica (19, 33, 42, 44, 51, 64, 111, 107, 118).

Outra hipótese para a associação das citocinas liberadas por TH1-TH2, é a que fala da presença de clones TH0 na DEVH crônica, que são células TH progenitoras com capacidade de expressão das citocinas produzidas por ambos os clones TH1 e TH2 (88, 106).

Poucas são as pesquisas que contemplam a expressão do RNA mensageiro (mRNA), para citocinas no transplante de intestino delgado. Recentemente este método tem sido utilizado como marcador da rejeição, pesquisa esta de grande valia, pós a deficiência de marcadores de rejeição e um dos principais problemas na avaliação da evolução imunológica deste transplante.

Farmer e col. (29), mostraram que no enxerto intestinal transplantado, a expressão de mRNA para IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α , não apenas se encontravam elevadas, como também precediam as alterações histopatológicas encontradas na reação de rejeição

aguda. Estes autores concluem afirmando, que a expressão destas citocinas podem ser um marcador precoce para a fase aguda de rejeição, no transplante de intestino delgado em ratos.

Usando camundongos, Quang e col. (81) avaliaram o padrão do TNF- α , IL-1b, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, MHC classe II e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM) no transplante heterotópico de intestino delgado, e observaram resultados similares aos anteriormente exposto. Estes autores também sugeriram que tratamento específico, no sentido de combater as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1b, e moléculas indutoras de citocinas MHC classe II e ICAM-1, pode ser benéfico no controle da rejeição no transplante de intestino.

Podemos identificar na literatura pertinente, apenas 2 trabalhos que se ocuparam em caracterizar o perfil das citocinas na DEVH, após o transplante de intestino delgado.

Utilizando o modelo do presente experimento, avaliou-se o expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ em língua, linfonodo cervical, e intestino delgado do receptor e do enxerto, antes e depois do aparecimento dos sinais clínicos de DEVH (42).

Verificou-se semelhante aumento da expressão das citocinas IL-10 e IFN- γ , antes e depois do aparecimento dos sinais de DEVH em língua e linfonodo cervical, quando comparado aos respectivos controles isogênicos. Este achado se relacionou com alterações histopatológicas grau 1 e 2 de DEVH respectivamente, evidenciando importante atividade imunológica nestes órgãos, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença. Não foi observado nenhuma alteração histopatológica ou das citocinas analisadas no intestino do receptor e no enxerto de intestino destes ratos, indo de encontro ao resultados encontrados na presente pesquisa. O envolvimento das citocinas IL-2 e IL-4 no desenvolvimento da DEVH foi pequeno, achado este que também foi observado em nosso estudo (42).

De fato, o comportamento da IL-2 e IL-4 neste modelo experimental é surpreendente, pois a expressão destas citocinas foi discreto, apesar de termos encontrado aumento de IL-2 em língua e de IL-4 em cervical linfonodo, quando comparado com os respectivos controles. Este fato provavelmente relaciona-se com o uso contínuo de FK-506. Esta droga tem como principal ação imunossupressora o antagonismo à calcineurina, que é uma fofatase reguladora da fosforilação, que promove a transcrição da IL-2 e IL-4 (36, 87, 114). Desta forma, o uso contínuo de FK-506 provavelmente interferiu na produção das citocinas IL-2 e IL-4, nas condições do presente modelo experimental. Esta condição também foi observado por outros autores (36, 87, 114).

Também usando ratos, Koide e cols. (58) utilizaram o modelo de DEVH baseado no cruzamento parental descrito por Monchick & Russel e dosaram IL-6, TNF- α e IFN- γ em intestino delgado e grosso do receptor, baço, fígado e linfonodos mesentéricos. Observaram aumento destas citocinas nestes tecidos, o que concorda em parte com os resultados obtidos no presente modelo experimental. A diferença do padrão de resposta de citocinas observado entre estes dois estudos ao nível do intestino do receptor, pode se relacionar com as diferenças metodológicas para indução de DEVH, onde no modelo de

Monchick & Russel a DEVH é de caráter agudo, portanto favorecendo o envolvimento do intestino delgado pela doença.

5.3. Do Quimerismo e Tolerância Imunológica

Quimerismo e tolerância são dois fenômenos imunológicos frequentemente utilizados como sinônimos, o que não corresponde a realidade.

Por definição quimera é um indivíduo cujo organismo contém populações de células derivadas de diferentes zigotos. Estes animais podem, contudo não apresentar tolerância imunológica, apesar de que este intercâmbio celular parece ser um dos mecanismos fundamentais para a indução de tolerância a longo prazo (15, 27, 55, 56, 68, 78, 84, 94, 96-101, 106, 113, 118). O quimerismo foi identificado inicialmente por Lillei, em 1916 (58) como *condition of freemartin* em gado bovino. Tal fenômeno foi observado, decorrente de estudos para o esclarecimento da causa de infertilidade em vacas.

Lillei observou que a infertilidade se dava em vacas nascidas de prenhez gemelar com sexos diferentes (63). Nesta condição a vaca grávida apresentava placenta com anastomoses vasculares que promovia a mistura do sangue dos gêmeos de diferentes sexos. Assim ocorria transferência intra-útero de hormônios masculino para embrião do sexo feminino, favorecendo aparecimento de anormalidades congênitas que provocavam a esterilidade.

Em 1945, Owen (77) estudou o mesmo fenômeno e verificou que na situação anteriormente descrita, os gêmeos apresentavam tipos de sangue idênticos, apesar de terem evidentes diferenças genéticas. Deste modo, este pesquisador foi quem primeiro inferiu que neste animais ocorriam importantes alterações imunológicas, e denominou esses gêmeos de mosaicos (na terminologia atual “quimeras mistos”). Portanto esses gêmeos, por terem compartilhado intra-útero do mesmo sangue, tinham enxertamento de células sangüíneas progenitoras de um no outro. Tais células de diferentes características genéticas, continuavam a se proliferar na vida adulta desses animais promovendo quimerismo em ambos.

A importância prática da observação de Owen foi observada pelo grupo de Medawar. Eles verificaram que transplante de enxerto de pele entre estes animais cursava sem rejeição, o que não ocorria quando o enxerto de pele era proveniente de outro animal bovino não gêmeo (terceira parte), que era prontamente rejeitado (11, 67). Deste modo Medawar e col. (11, 67) foram os primeiros a identificar que após o transplante, além da natural imunidade ativamente adquirida contra o enxerto, o seu inverso, ou seja, a tolerância ativamente adquirida, pode ser conseguida. Esse grupo foi também o primeiro a fazer a associação entre o quimerismo e a tolerância imunológica.

Baseando-se nestas observações, o grupo de Medawar iniciou tentativas de reprodução deste fenômeno em laboratório. Assim, descreveu o primeiro modelo de indução de tolerância por meio de infusão intra-uterina, de células provenientes do baço de camundongos da cepa A, em fetos de camundongos CBA. A imaturidade do sistema imunológico do camundongo CBA na fase intra-uterina favorecia a aceitação das células da cepa A. Na fase adulta, estes camundongos CBA previamente sensibilizados, apresentavam tolerância a enxerto de pele de camundongo A. Quando o enxerto de pele

foi realizado da cepa A para a CBA não sensibilizados na fase intra-uterina, o resultado foi a rejeição do enxerto (11).

Estes estudos pioneiros de tolerância trouxeram esperança de tentativa de indução de tolerância imunológica nos transplante de órgão clínicos, tendo em vista que nesta época as drogas imunossupressoras eram muito limitadas.

No início da década de 60, surgiu o controle da rejeição pós transplantes pela azatioprina e prednisona, a partir de então, apareceram drogas imunossupressoras de melhor eficácia, o que propiciou um melhor controle das reações imunológicas pós transplantes (114). Devido a isso (o aparecimento de novas drogas), paradoxalmente ocorreu desaceleração das pesquisas no campo de indução de tolerância imunológica

A impossibilidade da aplicabilidade clínica do modelo de Medawar, levou ao aparecimento de vários outros modelos de indução de tolerância em animais adultos.

Um dos modelos de grande importância na indução da tolerância imunológica, é o que utiliza a aplasia medular em animais receptores, com posterior infusão de células da medula óssea com depleção de linfócitos T, provenientes de animais alogênicos (quimera total), ou de animais alogênicos e isogênicos (quimera misto). Apesar de também não serem reproduzíveis clinicamente pelo perigo que a aplasia medular representa em seres humanos, este modelo ofereceu importantes informações para o entendimento da tolerância imunológica (76, 78, 106).

Neste sentido Orloff e cols. (76), realizaram indução de tolerância imunológica em TID de quimera misto, em experimento próximo ao da presente pesquisa. Estes autores irradiaram letalmente ratos Lewis e reconstituíram estes ratos com mistura de 50 milhões de células de medula óssea, proveniente de animais Lewis e ACI com depleção de células T. Após 30 dias estes animais recebiam TID e eram testados para quimerismo por meio de FACS. Os animais considerados quimeras (cerca de 60% dos animais que expressavam células do doador), apresentaram aceitação do enxerto de intestino (tolerância) com longa sobrevida (> que 100 dias). Os animais que não apresentavam quimerismo, tiveram rejeição do enxerto com morte precoce do animal (mediana de 8 dias). Neste modelo não houve presença de DEVH ou rejeição.

A ausência de DEVH no modelo acima exposto, se deu por reconstituição destes animais com células de medula óssea de baixa atividade imunológica, devido a depleção de linfócitos T. Nestas condições, a medula óssea transplantada apresentara diminuição da atividade imunológica, com redução da agressividade deste enxerto e portanto ausência de DEVH (76).

Por outro lado, no presente estudo houve 100% de DEVH, justamente por não termos diminuído a atividade imunológica das células imunocompetentes do doador.

Recentemente o grupo de Orloff publicou nova pesquisa, utilizando o modelo de tolerância imunológica do trabalho anteriormente discutido (70). Objetivando a investigação da sensibilidade a DEVH, nos animais submetidos ao condicionamento imunológico deste modelo, infundiu-se 250 milhões de esplenócitos de animais ACI em animais Lewis quimeras (tolerantes) e não quimeras.

Todos os animais quimeras apresentaram DEVH fatal após a infusão de células. Em contrapartida os animais que não apresentaram quimerismo, evoluíram com ausência de DEVH. Na conclusão deste trabalho afirma-se que a tolerância induzida pôr quimerismo misto promove maior sensibilidade à DEVH, que pode ser provocada se suficiente tecido linfóide do doador for novamente transplantado(70). Estes achados coincidem com os desta pesquisa, onde não promovemos modulação imunológica nem do doador, nem do receptor. Desta maneira o transplante combinado realizado na presente pesquisa promoveu aumento das células doador, no organismo do receptor, em quantidade e qualidade suficiente para promover DEVH, sem necessidade de novo transplante de células do doador.

Outro relevante modelo experimental de tolerância imunológica, é o transplante com sensibilização prévia do receptor aos antígenos do doador, por meio de repetidas transfusões sanguíneas do doador antes do transplante. Este modelo utilizado em principalmente em transplantes renais, é baseado em estudos que indicam que exposição intravenosa às células alogênicas, podem induzir profundas alterações no repertório de linfócitos T do receptor, incluindo a deleção funcional de linfócitos T citotóxicos (LTC), em relação aos antígenos de superfície do doador (15, 55, 56, 68, 78, 94, 118). Ocorreria também a estimulação de células reguladoras, as *veto cells*, que teriam a capacidade de suprimir a ação dos LTC contra o doador. Contudo, Lagaaij e cols.(59) mostraram que este tipo de indução de tolerância é efetivo somente quando o receptor compartilha com o doador de pelo menos um antígeno HLA-DR, como em muitos casos de transplante intervivos entre parentes.

O interessante fenômeno da tolerância imunológica só recentemente começou a ser melhor compreendido, graças ao grande avanço tecnológico na área de transplantes e ao desenvolvimento de novos modelos experimentais. O envolvimento de vários mediadores como citocinas, quemoquinas, proteínas do choque térmico, óxido nítrico e outros, alguns deles certamente ainda não identificados, tornam este fenômeno bastante complexo.

Os mecanismos que regem o aparecimento da tolerância ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se que ocorra envolvimento de diferentes fenótipos de células imunológicas principalmente as células progenitoras (Steen cells), células NK (Natural Killer), células dendríticas, linfócitos e células facilitadoras de tolerância e *veto cell*.

Evidências mostram que células apresentadoras de antígenos do doador, que migram após transplante ou transfusão sanguínea para o organismo do receptor, promoveriam deleção funcional ou apoptose de linfócitos T e B do receptor. Em consequência observa-se declínio da função dos LTC dirigido contra os antígenos HLA específicos do doador. Observou-se também que a interação entre os antígenos HLA-DR e -B do receptor e doador foi necessário para atingir a deleção clonal. Deste modo, Sheng-Tanner e cols. (94) mostraram que a resposta imune tolerante mediada por quimerismo persistente, depende de importante interação entre as células alogênicas. Esta interação culminaria com compartilhamento de antígenos de superfície (MHC classe I e classe II) entre estas células, promovendo portanto a tolerância imunológica.

Dentre as células envolvidas no processo de tolerância imunológica, duas têm merecido especial atenção, por apresentarem grande importância neste fenômeno: as células facilitadoras e as células reguladoras denominadas “veto cell”.

As células facilitadoras expressam antígenos de superfície CD8, CD3, CD45R, thy-1 e apresentam ausência dos antígenos $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ que são os antígenos implicados com produção de DEVH. Elas têm a capacidade de favorecer o enxertamento das células progenitoras do sistema imunológico no organismo do hospedeiro, sem causar DEVH (78, 88, 106).

Veto cell são células do doador com MHC classe I positivo e com expressão baixa do MHC classe II, que têm a propriedade de induzir à apoptose (morte celular programada) linfócitos T que a reconhecerem. Na verdade a *veto cell* interfere no linfócito T CD8⁺ (LTC) promovendo sua apoptose, mas talvez precedido por período de anergia, onde estas células tornariam-se tolerantes (78, 118, 55). Durante este período de anergia, reexposições destas células à células apresentadoras de antígeno do receptor e a IL-2, podem resgatar o clone da apoptose pôr induzir a sua proliferação em fenômeno conhecido como anergia reversa (55). Apesar de várias observações suportarem o conceito de veto cell, a identidade destas células ainda é motivo de controvérsia. É possível que vários tipos celulares teriam a possibilidade de induzir este fenômeno, dentre as quais, as mais implicadas seriam as células dendríticas imaturas (93, 78, 118).

O timo é um órgão também muito relacionado ao fenômeno da tolerância imunológica. Nele acredita-se que ocorra o mecanismo de tolerância chamado de central, onde clones de células T potencialmente reativas ao enxerto, seriam inativadas por deleção clonal ou seleção negativa (78, 118). Estes conhecimentos estimularam o uso de modelo experimental, que mostra que tolerância específica ao doador pode ser conseguida por introdução de antígenos do doador (esplenócitos ou células da medula óssea) no timo, antes do transplante de órgão (3, 48).

Estes modelos de administração intra-timo de aloantígenos para induzir tolerância específica contra o doador, enfatiza o papel da exposição dos timócitos imaturos a aloantígenos durante a maturação intratímica para o desenvolvimento de tolerância a aloenxertos de diferente MHC. Contudo, apesar da importância deste modelo, tolerância foi conseguida apenas em roedores. Sucesso em animais de grande porte ainda não foi observado (118).

Com o avanço do conhecimento deste fenômeno, foi possível identificar outro tipo de tolerância denominada periférica, que inclui: 1- anergia (inativação funcional dos linfócitos T), 2- supressão ativa e 3- deleção de linfócitos T reativos após reconhecimento antigênico (78).

Relacionando o modelo do presente experimento com os mecanismos de tolerância anteriormente expostos, podemos inferir que a ausência de rejeição no enxerto se deveu ao mecanismo de tolerância central e a ausência de acometimento do intestino do receptor pela DEVH, foi relacionado ao mecanismo de tolerância periférico.

Com a recente descoberta feita por Starzl e col.(96-101) de que após o transplante de órgão sólido existe um quimerismo natural, onde as células deste órgão migram para o

hospedeiro, podendo permanecer vivas indefinidamente e que estas células quiméricas representadas principalmente pelas células dendríticas, têm importância capital na indução da tolerância, revolucionou a imunologia do transplante de órgãos e abre novos horizontes para mais pesquisas neste assunto.

Algumas pesquisas colocam em cheque a participação do quimerismo na indução da tolerância imunológica; entretanto ao analisar os inúmeros trabalhos de grandes centros mundiais especializados no tema, cujos resultados se assemelham aos que ora apresentamos, achamo-nos cientificamente embasados, e concordamos com Strazl e cols. que em recente artigo (96) argumenta que tais contestações podem ser apressadas e desprovidas de uma mais acurada observação metodológica e científica

Neste modelo experimental observamos que, apesar do aumento do quimerismo promovido pelo transplante de medula óssea ter se relacionado com tolerância imunológica, ele também promoveu a DEVH. Esta observação nos leva a especular que o equilíbrio da interação bidirecional entre os componentes imunológicos do doador e receptor, pode ser quebrado pelo aumento da atividade imunológica do doador promovendo a rejeição, ou pelo aumento da atividade imunológica do componente do receptor promovendo a DEVH. A tolerância imunológica seria um ponto de equilíbrio situado entre estes dois extremos.

6. CONCLUSÕES.

Embora o quimerismo seja um campo já com muitos estudos científicos, podemos dizer ao final de nossos estudos, que mais interrogações surgiram, demonstrando o quanto estamos longe de conhecer a fisiologia biomolecular da imunologia de nosso próprio organismo, para usar este conhecimento em ações práticas de benefício clínico. Entretanto, além de evidenciar a necessidade de expansão do estudo do que pôde ser uma arma terapêutica nos transplantes, tiramos cinco conclusões principais:

1. O transplante simultâneo de intestino delgado e medula óssea entre ratos ACI (doadores) e Lewis (receptores) cursa inexoravelmente com doença do enxerto versus hospedeiro de evolução clínica progressiva, que conduz o animal ao êxito letal.
2. Existem células imunocompetentes da cepa doadora (ACI) no sangue periférico da receptora (Lewis) cuja quantidade aumenta progressivamente ao longo do tempo.
3. A doença do enxerto versus hospedeiro produziu alterações histopatológicas progressivas ao longo do tempo em língua e linfonodo cervical, sem acometimento do intestino delgado do receptor e do enxerto de intestino delgado.
4. No período tardio pós transplante ocorre aumento da produção de citocinas proveniente dos linfócitos TH1 e TH2 na língua e em linfonodo cervical e ausência de produção no intestino delgado do receptor e no enxerto.
5. Notou-se nos animais com longa sobrevida, tolerância imunológica aos doadores, verificada por meio da hiporreatividade imunológica destes animais aos linfócitos de animais da cepa ACI (doadores) e pela ausência de qualquer sinal de rejeição ao intestino delgado transplantado.

7. REFERÊNCIAS:

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. - Antibodies and antigens. Em: **Cellular and Molecular Immunology**. 2º Edição. Ed. W.B. Saunders Company. pg 34-61, 1994.
2. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. - The major histocompatibility complex. Em: **Cellular and Molecular Immunology**. 2º Edição. Ed. W.B. Saunders Company. pg 97-113, 1994.
3. ALFREY, E.J.; WANG, X.; LEE, L.; HOLM, B.; KIM, J.; ADAMS, G.; DAFOE, D.C. - Tolerance induced by direct inoculation of donor antigen into the thymus in low and high responder rodent. **Transplantation**, **59**:1171-76, 1995.
4. ANTIN, J.H. & FERRARA, J.L.M. - Cytokine dysregulation and acute graft versus host disease. **Blood**, **80**:2964-68, 1992.
5. BAKER, K.S.; ALLEN, R.D.; ROTH, J.B.; SIDMAN, C.L. - Kinetic and organ-specific patterns of cytokine expression in acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant.**, **15**:595-603, 1995
6. BALKWILL, F.R. & BURRKE, F. - The Cytokine network. **Immunol. Today** **10**:229-304, 1989.
7. BARBER, W.H.; MANKIN, J.A.; LASKOW, D.A.; DEIERHOI, M.H.; JULIAN, B.A.; CURTS, J.J.; DIETHELM, A.G. - Long term results of controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. **Transplantation**. **51**:70-5, 1991.
8. BHADURI, B.R.; TAN, K.C.; HUMPHREYS, S. - Graft-versus-host disease after orthotopic liver transplantation in a child. **Transplant. Proc.**, **22**:2378-80, 1990.
9. BILLINGHAM, R.E. & BRENT, L. - A simple method for inducing tolerance of skin homograft in mice. **Transplant. Bull.**, **4**: 67-74, 1957.
10. BILLINGHAM, R.E. - The biology of graft-versus-host reaction. Em: **The Harvey Lectures**. Academic Press: New York. pp. 21-78, 1966.
11. BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWAR P.B. - Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature** **172**: 603, 1953.
12. BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L. - Quantitative studies on transplantation immunity: IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)**, **242**: 242-39, 1959.

13. BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWAR P.B.. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. **Philos. Transp R Soc Lond (Biol)** **239**: 357, 1956
14. BURDICK, J.F.; VOGELSANG, G.B.; SMITH, W.J. - Severe graft-versus-host disease in a liver transplante recipient, **New Engl. J. Med.**, **319**:689-91, 1988.
15. BURLINGHAM, W.J.; GRAILER, A.P.; FECHINER, J.H. - Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. **Transplantation**, **59**:1147-53, 1995.
16. CARREL A - La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des visceres, **Lyon MEO**, **98**:859-864, 1902.
17. CHOWDHURY, N.C.; JIN, M.X.; HARDY, M.A.; OLUWOLE, S.F. - Prevention of graft-versus-host disease after bone marrow and small bowel transplantation by ultraviolet B modulation of bone marrw cells. **Transplant. Proc.**, **25**:475-6, 1993.
18. CHOMCZYNSKI, P. & SANCCHI, N. - Single-step method of RNA solation by acid guanidinium thiocyanate-Phenol-chloroforextraction. **Anal. Biochem.**, **162**:156-9, 1987.
19. DALLMAN, M.J. - Cytokines as a mediator of organ graft rejection and rolerance. **Curr. Opin. Immunol.**, **5**:788-793, 1993.
20. DALLMAN, M.J.; LARSEN, C.P.; MORRIS, P.J. - Cytokines gene transcription in vascularized organ grafts:analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. **J. Exp. Med.**, **174**:493-99, 1991.
21. DeBRUIN, R.W.F.; SAAT, R.E.; HEINEMAN, E.; JEEKEL, J.; MARKET, R.L. - The effect of cyclosporine A in small-bowel transplantation in rat is dependent on the strain combination used. **Transplant. Proc.**, **22**:2472, 1990
22. DeBRUIN, R.W.F.; HOGENESCH, H.; HEINEMAN, E.; JEEKEL, J.; MARKET, R.L. Fulminant graft-versus-host disease after FK-506 treatment in fully allogeneic small bowel transplantation. **Transplant. Proc.**, **23**:3257, 1991
23. DEEG, H.J. & COTTLER-FOX, M. - Clinical spectrum and patho-physiology of graft-versus-host disease. Em: **Graft-Versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment**. BURAKOFF, S.J.; DEEG, H.J.; FERRARA, J.; ATKINSON, K. (eds). MARCEL DEKKER: New York, pp. 331-335, 1990.
24. DELTZ, E.; SCHROEDER, P.; GEBHARDT, H. - Successful clinical small bowel transplantation: report of a case. **Clin. Transplantation**, **3**:89-91, 1989.

25. DEMETRIS, A.J.; MURASE N.; FUJISAKI, S.; FUNG, J.J.; RAO, A.S.; STARZL, T.E., Hematolymphoid cell trafficking, microchimerism, and GVHD reaction after liver, bone marrow, and heart transplantation. **Transplant. Proc.** **25**:3337-44, 1993.
26. DEMETRIS, A.J.; MURASE N.; YE, Q.; GALVÃO F.H.F.; RICHERT, C.; SAAD, R.; PHAM, S.; DUQUESNOY, R.; ZEEVI, A.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy. Possible contribution of donor antigen-presenting cells and lymphatic disruption. **Am. J. Pathol.**, **150**:563-577, 1997
27. DEMETRIS, A.J.; MURASE N.; GALVÃO F.H.F.; PHAM, S.; DUQUESNOY, R.; ZEEVI, A.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Leukocyte trafficking, microchimerism and the immunolymphatic theory of chronic rejection. **Am. J. Pathol.**, "no prelo".
28. FANDRICH, F.; SCHRODER, J.; JAHNKE, T.; DRESSKE, T.; CHAMBERS, W.H.; ZAVAZAVA, N. - Modulation of graft-versus-host related disease by donors-specific natural killer cell activity following semiallogeneic small bowel transplantation in the rat. **Transplant. Proc.**, **28**:3267-8, 1996.
29. FARMER, D.G.; McDIARMID, S.V.; KUNIYOSHI, J.; ROBERT, M.E.; SHAKED, A.; BUSSUTTL, R.W. - Intragraft expresion of messenger RNA for Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor Alfa is a predictor of rat small intestine transplant rejection. **J. Surg. Res.**, **57**:138-142, 1994.
30. FERRARA, J.L.M. - Cytokine dysregulation as a mechanism of graft-versus-host disease. **Cur. Opin. Immunol.**, **5**:794-99, 1993.
31. FERRARA, J.L.M. & DEEG, H.J. - Graft-versus-host disease. **New Engl. J. Med.**, **324**:667-74, 1991.
32. FONTES, P.; RAO, A.; DEMETRIS, A.J.; ZEEVI, A.; TRUCCO, M.; CARROL, P.; RYBKA, W.; RUDEST, W.A.; RICORD, C.; DODSON, F.; SHAPIRO, R.; TZAKIS, A.; TODO, S.; ABU-ELMAGD, K.; JORDAN, M.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Augmentation with bone marrow of donor leukocyte migration for kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation. **Lancet**, **344**:151-5, 1994.
33. FORGES, O.; MORRIS, P.J.; DALLMAN, M.J. - Spontaneous acceptance of liver allograft in the rat. **Transplantation**, **57**:171-8, 1994.
34. FORMAN, S.J.; BLUME, K.G.; KRANCE, R.A. - A prospective randomized study of acute graft-versus-host disease in 107 patients with leukemia: methotrexate/prednisone versus cyclosporine A/ prednisone. **Transplant. Proc.**, **19**:2605-2607, 1987.
35. FORTNER, J.G.; SICHUK, G.; LITWIN, S.D.; BEATTIE Jr, E.J. - Immunological response to an intestinal allograft with HLA identical donor-recipient. **Transplantation**, **14**:531-5, 1972.

36. FREEMAN, G.J.; BOUSSIOTIS, V.A.; ANUMANTHAN, A.; BERNSTEIN, G.M.; KE, X-Y.; NADLER, L.M. - B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4.

Immunity 2:523-44, 1995.

37. FURUKAWA, H. - Current status of small bowel transplantation at the University of Pittsburgh. **Pittsburgh Transplantation Institute Conference**, Abstract book, pg 97-102, 1996.

38. GALE, R.P.; BORTIN, M.M.; van BEKKUM, D.W. - Risk factors for acute graft-versus-host disease. **Br. J. Haematol.**, 67:397-406, 1987.

39. GALVÃO, F.H.F. - Comparação entre as soluções da Universidade de Wisconsin e Euro-Collins na preservação hipotérmica do intestino delgado - Estudo experimental em ratos. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Escola Paulista de Medicina (Nível de Mestrado). São Paulo, 1992.

40. GALVÃO, F.H.F.; LEE, A.D.W.; TOLOSA, E.M.C. - Técnica microcirúrgica do transplante ortotópico de intestino delgado em ratos. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, 25-29 julho, 1993

41. GALVÃO F.H.F.; WAITZBERG, D.L.; LOGULO, A.; SEMENTILLI, A.; ROMPENSO, S.C.; GONÇALVES, E.L. - Alterações histopatológicas do intestino delgado após preservação hipotérmica com as soluções da Universidade de Wisconsin e Euro-Collins. Estudo experimental. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 41:187-92, 1995.

42. GALVÃO F.H.F.; MURASE, N.; TODO, S.; ZEEVI, A.; YE, Q.; DOUGHTON, C.S.; DEMETRIS A. J.; WAITZBERG, D.L.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Cytokine profile in graft-versus-host disease after small bowel transplantation. **Transplant. Proc.**, 28:2455, 1996.

43. GALVÃO F.H.F.; WAITZBERG, D.L.; LOGULO, A.; SOARES, S.; GONÇALVES, E.L. - Histological and permeability alterations in cold-stored small bowel: A comparison of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. **Transplant. Proc.**, 26:1496, 1994.

44. GALVÃO F.H.F.; YE, Q.; DOUGHTON, C.S.; MURASE, N.; TODO, S.; ZEEVI, A.; WAITZBERG, D.L.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Experimental animal model of graft-versus-host disease (GVHD) after small bowel transplantation: Characteristics of the model and application for developing treatment strategies. **Transplant. Proc.**, 29: 700, 1997.

45. GLUCKSBERG, H.; STORB, R.; FEFER, A. - Clinical manifestation of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. **Transplantation**, 18:295-99, 1974

46. GOULET, O.; REVILLON, Y; BROUSSE N. - Successful small bowel transplantation in an infant. **Transplantation**, **53**:940-3, 1992.
47. GRANT, D.; WALL, W.; MIMEAULT, R. - Successful small bowel-liver transplantation. **Lancet**, **335**:181-4, 1990.
48. GROSS, J.A.; NAKAFUSA, Y.; FLYE, W. - Intrathymic injection of donor-alloantigens induces donor-specific vascularized allograft tolerance without immunosuppression. **Ann. Surg.**, **216**:409-14, 1992.
49. HERVE, P.; CAHN, J.Y.; BEATTY, P.G. - Graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from donors others than HLA-identical siblings. In: **Graft-Versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment**. BURAKOFF, S.J.; DEEG, H.J.; FERRARA, J.; ATKINSON, K. (eds). MARCEL DEKKER: New York, pp. 425-32, 1990.
50. HOFFMAN, A.L.; MAKOWKA, L.; BANNER, B. - The use of FK-506 for small intestine transplantation: inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. **Transplantation**, **49**:483-9, 1990.
51. HOLAN, V.; SEDLACKOVA, K.; RUZICKOVA, M. - Production of high levels of Th1 e Th2 cytokines in mice with acquired transplantation tolerance. **Cell Immunology**, **174**: 7-12, 1996.
52. HOLLER, E.; KOLB, H.J.; MITTERMULLER, J.; KAUL, M.; LEDERSE, G.; DUELL, T.; SEEGER, B.; SCHLEUNING, M.; HINTERMEIER-KNABE, R.; ERTL, B.; KEMPENI, J.; WILMANN, W. - Modulation of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor α (TNF- α) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF- α (MAK 195F). **Blood**, **86**:890-9, 1995.
53. INNIS, M.A.; GELFAND D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE T.J. - **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, CA: Academic. 1990
54. JAMIELSON, N.V.; JOYSEY, V.; FRIEND, P.J.; MARCUS, R.; RAMSBOTTOM, S.; BAGLIN, T.; JOHNSTON, P.; WILLIAN, R.; CALNE, R.Y.- Graft-versus-host disease in solid organ transplantation. **Transplant. Int.**, **4**:67-71, 1991.
55. JENKINS, M.K - The role of cell division in the induction of clonal anergy. **Immunol. Today**, **13**:69-76, 1992
56. JANKOWISK, R.A. & ILDESTAD, S.T. - Current progress in chimerism and donor-specific tolerance. **Transplant. Proc.**, **28**:2071-74, 1996.
57. KEENAN, R.J.; ZEEVI, A.; IACONO, A.T. - Efficacy of inhaled cyclosporine in lung transplant patients with refractory rejection: Correlation of intra-graft cytokine gene expression with pulmonary function and histology. **Surgery**, 1995.

58. KOIDE, S.; McVAY, L.D.; FRANKEL, W.L.; BEHLING, C.A.; ZHOU, E.D.; SHI, T.; ZHANG, W.; ROMBEAU, J.L. - Increased expression of tissue cytokines in graft-versus-host disease after small bowel transplantation. **Transplantation**, **64**:518-24, 1997.
59. LAGAAIJ, E.L.; HENNEMAN, I.P.H.; RUIGROK, M. - Effect of one-HLA-DR antigen matched and completely HLA-DR mismatched blood transfusion on survival of heart and kidney allografts. **N. Engl. J. Med.**, **321**:701-9, 1989.
60. LANGREHR, J.M.; MARKUS, P.M.; BANNER, B.; LEE, K.K.W.; SCHRAUT, W.H. - Induction of chronic graft-versus-host disease in a rat model after transplantation of sensitized small bowel allografts. **Am. J. Surg.**, **167**: 579-84, 1994.
61. LILLEHEI, R.C.; GOOTT, B.; MILLER, F.A. - The physiological response of the small bowel of dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacemet and survival. **Ann. Surg.**, **150**:543-60, 1959.
62. LILLEHEI, R.C.; IDEZUKI, Y.; FEEMSTER, J.A.; DIETZMAN, R.H.; KELLY, W.D.; MERKEL, F.K.; GOETZ, F.C.; LYONS, G.W.; MANAX, W.G. - Transplantation of stomach, intestine and pancreas:experimental and clinical observations. **Surgery**, **62**:721-41, 1967
63. LILLIE, F.R. - **Science**, **27**:611-20, 1916.
64. LOWRY, R.P. - The relationship of IL-4, IL-10 and other cytokines to transplantation tolerance. **Transplant. Science**, **3**: 104-12, 1993.
65. MARKUS, P.M.; CAI, X.; MING, W.; DEMETRIS, A.J.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Prevention of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation in rats using FK-506. **Transplantation**, **52**:590-4, 1991.
66. McCARTHY Jr, L.; ABHYANKAR, S.; NEBEN, S.; NEWMAN, G.; SIEFF, C.; THOMPSON, R.C.; BURAKOFF, S.;FERRARA, J.L.M. - Inhibition of interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. **Blood**, **78**:1915-8, 1991.
67. MEDAWAR, P.B. - Transplantation of tissues and organs. **Br. Med. Bull.** **21**: 97, 1965
68. MONACO, A.P.; WOOD, M.L.; MAKI, T.; GOZZO, J. - The use of donor specific unresponsiveness (tolerance) to tissue allografts. Em: **Chimerism and Tolerance** (ed. Ildstad S.T.) R.G. Landes Company, Texas, p. 99-109, 1994.
69. MONCHICK, G.J. & RUSSEL, P.S. - Transplantation of small bowel in the rat: technical and imunological considerations. **Surgery**, **70**:693-702, 1971.
70. MORRISSEY N.J.; BLOM, D.; RYAN, C.; FISHER, T.; BRONSTHER, O.; ORLOFF, M. - Graft versus host desease in rats made tolerant for organ allograft. **J. Surg. Res.**, **69**:307-15, 1997.

71. MOSMANN, T.R. & Coffman, R.L. - TH1 e TH2 cell: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol.** 7:145, 1989.
72. MURASE N.; DEMETRIS A. J.; WOO, J.; TODO, T.; STARZL, T.E. - Lymphocyte traffic and GVHD after fully allogeneic small bowel transplantation. **Transplant. Proc.**, 23:3246, 1991.
73. MURASE N.; TANABE, M.; FUJISAKI, S.; MIYAZAWA H.; YE, Q.; DELANEY, C.P.; DEMETRIS A. J.; STARZL, T.E. - Variable chimerism, graft versus host disease and tolerance after different kinds of cell and solid organ transplantation from Lewis to Brown-Norway rats **Transplantation** 60:158-71, 1995.
74. MURASE N.; WOO, J.; TANABE, M.; FURUYA, T.; TODO, T.; STARZL, T.E. - Graft-versus-host disease after Brown Norway to Lewis and Lewis to Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506. **Transplantation**, 55:1-7, 1993.
75. OKUMURA, M.; FUJIMARA, I.; FERRARI, A.A.; NAKIRI, K.; LEMOS, P.C.P.; ANDREA, E.A.; BAHDUR, R.; MREK, S.R.; YASBEK NETO, M.J.; POSSO, B.J.M.; MAGALD, J.B.; PAULA, W.; RAI, A.A. - Transplante do intestino delgado: apresentação de um caso. **Rev. Hosp.Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo**, 24:39-43, 1969.
76. ORLOFF, M.S.; FALLON, M.A.; DeMARA, E.; COPPAGE, M.L.; LEONG, N.; CERILLI, J. - Induction of specific tolerance to small bowel allografts. **Surgery**, 116:222-9, 1994.
77. OWEN, R.D. - The immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. **Science**, 102:400-406, 1945.
78. PHAM, S.T. & ILDSTAD, S.T. - New concepts in immunobiology. **Seminars in Anesthesia**. 14: 74-84, 1995.
79. PIRENNE, J. - Short-bowel syndrome. Medical aspects and prospects of intestinal transplantation. **Acta Chir. Belg.**, 96(4):150-4, 1996.
80. PRICE B.A., CUMBERLAND, N.S.; INGHAM, C.L.; POCKLEY, A.G.; LEAR, P.A.; WOOD, R.F.M. - The effect of rejection and graft-versus-host disease on small intestinal microflora and bacterial translocation after rat small bowel transplantation. **Transplantation**, 56:1072-76, 1993.
81. QUAN D.; GRANT, D.; ZHONG, R.; ZHANG, Z.; GARCIA, B.M.; JEVINIKAR, A.M. - Altered gene expression of cytokine, ICAM-1, and class II molecules precedes mouse intestinal allograft rejection. **Transplantation**, 58: 808-16, 1994.
82. RACADOT, E.; MILPIED, N.; BORDIGONI, P.; CAHN, J.Y.; PLOUVIER, E.; LIOURE, B.; LUTZ, P.; WIJDENES, J.; HERVE, P. - Sequential use of three monoclonal antibodies in corticosteroid-resistant acute GVHD: a multicentric pilot study including 15 patients. **Bone Marrow Transplant.**, 15:669-77, 1995.

83. RAMOS, H.; REYES, ABU-ELMAGD, K.; ZEEVI, A.; TZAKIS, A.; DEMETRIS, A.J.; FUNG, J.J.; FLYNN, B.; McMICHAEL, J.; EBERT, F.; STARZL, T.E. - Weaning of immunosuppression in long term liver transplant recipients. **Transplantation**, **59**:212-17, 1995.
84. RAO, A.S.; STARZL, T.E.; DEMETRIS, A.J.; TRUCCO, M.; THOSON, A.W.; QIAN S.; MURASE N.; FUNG, J.J. - The two-way paradigm of transplantation immunology. **Clin. Immunol. immunopathol.**, **80**(3 Pt2): 46-51, 1996.
85. RICORD, C.; TZAKIS, A.; DEMETRIS, A.J.; ZEEVI, A.; RYBKA, W.; NALESNIK, M.; UKAH, F.; BALL, E.; STARZL, T.E. - Reversal of graft-versus-host disease with infusion of stored autologous bone marrow allotransplantation in man. **Transplant. Sci.**, **3**:76-7, 1993.
86. ROBERTS, J.P.; ASCHER, N.L.; LAKE, J.; CAPPER, J.; PUROHIT, S.; GAROVOY, M.; LYNCH, R.; FERREL, L.; WHIGHT, T. - Graft vs. host disease after liver transplantation in humans: a report of four cases. **Hepatology**, **14**:274-81, 1991.
87. ROONEY, J.W.; HOEY, T.; GLINCHER, L.H. - Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. **Immunity** **2**:473-84, 1995.
88. RUEDI, e.; SYKES, M.; ILDSTAD, S.T. - antiviral T cell competence and restriction specificity of mixed allogeneic irradiation chimeras. **Cell Immunol.** **121**: 185-95, 1988.
89. SAHIN, S.; AKOGLU, T.; GURBUS, O.; ERGUM, T.; KULLUM, S.; SAV, A.; AHISKALI, R.; TUZUNER, N.; DOGUSOY, G. - Re-evaluation of skin-explant model in graft-versus-host disease prediction. **Clin. Transplant.**, **9**:370-74, 1995.
90. SANDBORN, W.J.; HAY, T.E.; PORAYKO, M.K. - Cyclosporine withdrawal for nephrotoxicity in liver transplant recipients does not result in improvement in kidney function and causes cellular and ductopenic rejection. **Hepatology**, **19**:925, 1994.
91. SHULMAN, H.M.; SALE, G.E. - Pathology of acute and chronic cutaneous GVHD. Em: SALE, G.E.; SHULMAN, H.M., eds. **The pathology of bone marrow transplantation**. New York: Masson Publishing USA Inc; pp. 40, 1984.
92. SHAFFER, D.; BLAKERY, M.L.; GOTTSCHALK, R.; MONACO, A.P. - Small bowel transplantation in rats using RS-61443: effect on GVHD and rejection. **Transp. Proc.**, **24**:1159, 1992.
93. SCHRAUT, W.H. - Current status of small bowel transplantation. **Gastroenterology**, **94**:527-38, 1988.
94. SHENG-TANNER, X.; MILLER, R.G. - Correlation between lymphocyte-induced donor-specific tolerance and donor cell recirculation. **J. Exp. Med.**, **176**:407-13, 1992.

95. SIMONSEN, M. - The impact on the development embryo and newborn animal of adult homologous cells. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, **40**:480-7, 1957.
96. STARZL, T.E.; RAO, A.S.; THOMSON, A.W.; MURASE, N.; DEMETRIS, A.J. - Donor-recipient micrichimerism and tolerance induction. **Transplantation**, **61**:169-70, 1996.
97. STARZL, T.E. & DEMETRIS A.J. - Transplantation milestone: Viewed with one - and two-way of tolerance - **JAMA**, **273**: 876-9, 1995.
98. STARZL, T.E.; DEMETRIS, A.J.; MURASE N.; THOSON, A.W.; TRUCCO, M.; RICORD, C. - Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation. **Immunol. Today**, **14**:326-331, 1993
99. STARZL, T.E.; DEMETRIS A. J.; TRUCCO M.; MURASE N.; ILDESTAD S.; RICORD, C. - Cell migration, Chimerism and graft acceptance. **Lancet** **339**:1579-82, 1992
100. STARZL, T.E.; DEMETRIS, A.J.; TRUCCO, M.; MURASE N.; RICORD, C.; ILDESTAD, S.T.; RAMOS, H.; TODO, S.; TZAKIS, A.; FUNG, J.J.; NALESNIK, M.; RUDEST, W.A.; KOCOVA, M. - Cell migration and chimerism after whole organ transplantation: The basis of graft acceptance. **Hepatology**, **17**:1127-52, 1993.
101. STARZL, T.E.; DEMETRIS, A.J.; TRUCCO, M.; ZEEVI, A. - Chimerism and donor nonreactivity 27 to 29 years after Kidney allotransplantation. **Transplantation** **55**: 1272-7, 1993.
102. STARZL T.E. & KAUPP, H.A. - Mass homotransplantation of abdominal organs in dogs. **Surg. Forum**, **11**:219-29, 1960.
103. STEPKOWSKI, S.M.; CHEN, H.F.; WANG, M.E.; DALOSE, P.; KAHAN, B.D. - Inhibition of host-versus-graft and graft-versus-host responses after small bowel transplantation in rats by rapamycin. **Transplantation**, **53**:258, 1992.
104. SYKES, M. & PEARSON, D.A. - Alloengraftment in IL-2 treated mice. **Bone Marrow Transplant.**, **10**:157-63, 1992.
105. SYKES, M.; PEARSON, D.A.; SZOT, G.L. - IL-2 induced GVHD protection is not inhibited by cyclosporine and is maximal when IL-2 is given over a 25 h period beginning on the day following bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, **15**:395-9, 1995.
106. SYKES, M. & SACHS, D.H. - Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation. **Immunol. Today**, **9**: 23-7, 1988.

107. TAKEUCHI, T.; LOWRY, R.P.; KONIECZNY, B. - Heart grafts in murine systems: The differential activation of TH2-like effector in peripheral tolerance. **Transplantation**, **53**:1281-94, 1992.
108. TANABE, M.; MURASE, N.; DEMETRIS, A.J.; HOFFMAN, R.A.; NAKAMURA, S.; FUJISAKI, S.; GALVÃO, F.H.F.; TODO, S.; STARZL, T.E. - Influence of donor-recipient strain combinations on immunologic responses after allogeneic rat small bowel transplantation. **Transplant. Proc.** **26**:1569-70, 1994.
109. TANABE, M.; MURASE, N.; DEMETRIS, A.J.; HOFFMAN, R.A.; NAKAMURA, S.; FUJISAKI, S.; GALVÃO, F.H.F.; TODO, S.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Influence of donor and recipient strains in isolated small bowel transplantation in the rat. **Transplant. Proc.** **26**:3733-40, 1994.
110. TEYTON, L.; O'SULLIVAN, D.; DICKSON, P.W. - Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. **Nature**, **348**:39-45, 1990.
111. THAI, N.L.; FU, F.; QIAN, S.; SUN, H.; GAO, L.; WANG, S.C.; DEMETRIS, A.J.; WOO, J.; THOMSON, A.W.; DUQUESNOY, R.J.; FUNG, J.J. - Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. **Transplantation**, **59**:274-81, 1995.
112. THEOBALD, M. - Alloreognition and graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant.**, **15**:489-98, 1995.
113. THOMAS, J.M.; CARVER, M.; CUNNINGHAM, P. - Promotion of incompatible allograft acceptance in rhesus monkeys given post-transplant anti-thymocyte globulin and donor bone marrow. I. In vivo parameters and immunohistologic evidence suggesting microchimerism. **Transplantation**. **43**:332-39, 1987.
114. THOMSON, A.W. - Immunosuppressive drugs and the induction of transplantation tolerance. **Transplant. immunology**, **2**:263-270, 1994.
115. TODO, S.; REYES, J.; FURUKAWA, H.; ABU-ELMAGD, K.; LEE, R.G.; TZAKIS, A.; RAO, A.S.; STARZL, T.E. - Outcome analysis of 71 clinical intestinal transplantations. **Ann. Surg.** **222**:270-82, 1995.
116. TODO, S.; TZAKIS, A.; ABU-ELMAGD, K.; REYES, J.; STARZL, T.E. - Current status of intestinal transplantation. **Advances in Surgery**, **27**:295-316, 1994.
117. WOOD, R.F.M. & POCKLEY, A.G. - Small bowel transplantation. **Transplant. Immunology**, **2**:163-6, 1994.
118. WOOD, K.J. - New concepts in tolerance. **Clin. Transplant.**, **10**: 93-9, 1996.

119. YE, Q.; DEMETRIS, A.J.; GALVÃO F.H.F.; TOYAMA, Y.; DOUGHTON, C.S.; TODO, S.; STARZL, T.E.; MURASE N. - Persistence of donor cells and incidence of graft-versus-host disease after simultaneous small bowel and bone marrow transplantation. **Transplant. Proc.**, **28**:2453, 1996

APÊNDICE

Tabela 1

Sequências de DNA dos “primers” específicos para β -actina e para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α de ratos:

- β -actina:	senso 5'-TTC ATG GAT GCC ACA GGA TTC- 3' antisenso 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG-3'
- IL-2	senso 5'-CAG ATG GCT ATC CAT CTC CTC-3' antisenso 5'-ACG CTT GTC CTC CTT GTC AAC-3'
- IL-4	senso 5'-TTC TCA GTG AGT TCA GAC CGC-3' antisenso 5'-GAC TCC ATG CAC CGA GAT GTT-3'
- IL-6	senso 5'-ACA GCG ATG ATG CAC TGT CAG-3' antisenso 5'-ATG GTC TTG GTC CTT AGC CAC-3'
- IL-10	senso 5'-GTT CAC AGA GAA GCT CAG T-3' antisenso 5'-TTA CTT GGG TTG CCA AGC CTT-3'
- IFN- γ	senso 5'-CTC GAA CTT GGC GAT GCT CAT-3' antisenso 5'-CAA GGC ACA CTC ATT GAA AGC-3'
- TNF- α	senso 5'-GAG GCT GAC TTT CTC CTG GTA-3' antisenso 5'-TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG-3'

Tabela 2

Evolução do Peso Corpóreo nos animais do Grupo E1

POD	Rato 1	Rato 2	Rato 3	rato 4	Rato 5	Rato 6
0	237	243	233	235	250	220
7	229	210	191	216	230	205
14	219	220	230	224	270	230
21	232	241	248	236	293	239
28	255	263	270	252	318	260
35	289	273	285	272	328	278
42	297	290	300	284	337	297
49	307	297	302	300	354	300
56	315	305	300	308	355	314
63	327	308	313	317	360	325
70	330	317	305	325	362	328
77	349	333	304	341	364	330
84	344	325	304	357	361	337
91	341	330	301	355	338	332
98	337	317	299	349	327	320
105	329	315	283	338	312	315
112	310	310	275	323	296	294
120	296	300	260	310	276	283

Tabela 3Evolução do Peso Corpóreo nos Animais do Grupo C1

DPO	Rato1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6
0	234	239	237	234	250	220
7	226	218	231	220	230	205
14	220	220	219	224	270	230
21	233	241	227	238	293	239
28	247	263	238	252	318	260
35	268	275	249	275	328	278
42	289	290	272	284	337	297
49	300	297	291	303	354	300
56	311	306	295	308	355	314
63	329	313	315	319	360	325
70	337	321	339	325	362	328
77	339	333	344	341	364	330
84	343	340	348	357	369	337
91	359	347	346	359	373	339
98	363	352	356	361	382	338
105	369	349	356	371	388	348
112	382	358	364	369	392	351
119	390	362	359	372	402	353

Tabela 4

Evolução do Peso Corpóreo nos Animais do Grupo E2

DPO	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
0	220	249	239	232	238	242	220	250
7	197	244	245	194	231	204	205	218
14	208	260	219	220	216	230	230	231
21	227	279	232	239	213	249	239	263
28	230	292	257	263	236	273	260	270
35	233	304	289	270	249	280	278	290
42	260	312	299	280	272	290	297	307
49	274	319	305	297	289	306	300	317
56	282	321	317	302	295	311	314	317
63	285	320	324	308	310	317	325	322
70	303	323	330	315	339	326	328	328
77	315	331	336	326	319	335	330	331
84	327	332	346	330	337	336	337	342
91	336	346	346	330	322	342	332	345
98	325	342	341	327	311	341	325	350
105	319	346	336	328	309	344	320	350
112	310	324	314	328	304	337	294	348
119	312	322	296	329	301	338	294	338
126	307	310	294	316	285	326	286	332
133	302	263	290	318	294	320	274	326
140	299	253	286	310	285	315	268	328
147	301	248	272	293	287	303	258	321
154	297	241	276	264	272	274	252	315
161	300	242	264	238	268	247	249	301
168	293	240	256	242	263	242	242	289
175	287	222	242	241	265	239	238	273
182	271	205	241	236	260	236	235	269
189	269		237	234	254	230	226	260
196	264		230	241	259	241		255
203	259		231	243	252	243		257
210	258		219	240	255	240		243
217	251			237	249	233		233
224	248			237	243	237		
231				236	243	236		
238				243	237	237		
245				235	232			
252				237				
259				231				
266				240				
273				231				

Tabela 5

Evolução do Peso Corpóreo nos Animais do Grupo C2

DPO	Rato1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5
0	221	232	241	238	227
7	191	211	222	211	181 ^{kg}
14	230	232	211	219	200
21	248	240	232	236	219
28	270	257	257	247	223
35	285	271	274	259	241
42	300	289	292	262	249
49	302	297	300	271	253
56	300	306	312	289	267
63	313	321	321	312	279
70	316	330	334	321	292
77	321	334	352	324	309
84	324	339	359	339	319
91	332	343	360	343	321
98	330	348	371	348	324
105	341	347	375	347	340
112	339	365	383	352	339
119	346	372	393	349	341
126	349	381	403	356	349
133	352	380	412	350	353
140	350	379	421	358	359
147	357	383	427	362	357
154	359	380	436	368	360
161	358	379	442	373	353
168	371	381	441	398	357
175	369	380	445	402	361
182	375	390	439	411	370
189	373	392	442	415	370
196	379	399		428	369
203	380	402		413	373
210	378	403		423	
217	383	406		435	
224		414		463	
231		421		471	
238		428			
245		426			
252		437			
259		439			

Tabela 6

Evolução Clínica dos Animais do Grupo E1

DPO	Rato1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0
77	0	0	0	0	0	0
84	+	0	0	+	0	0
91	+	0	0	+	0	0
98	+	0	0	+	0	+
105	+	0	+	+	0	+
112	++	+	+	+	0	+
119	++	+	+	++	+	+

Tabela 7

Evolução Clínica dos Animais do Grupo E2

DPO	Rato1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0
77	0	0	0	+	0	0	0	0
84	0	0	0	+	0	0	+	0
91	0	0	0	+	+	0	+	0
98	+	0	+	+	+	+	+	0
105	+	+	+	+	+	+	+	+
112	+	+	+	+	+	+	++	+
119	+	+	+	+	+	+	++	+
126	+	+	+	+	++	+	++	+
133	+	++	++	+	++	+	++	+
140	++	++	++	+	++	+	++	+
147	++	++	++	++	++	++	++	+
154	++	++	++	++	++	++	++	++
161	++	+++	++	++	++	++	++	++
168	++	+++	++	++	++	++	+++	++
175	++	+++	+++	++	++	++	+++	++
182	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++
189	++		+++	++	++	+++	+++	++
196	++		+++	++	++	+++		++
203	++		+++	++	++	+++		++
210	++		+++	+++	++	+++		+++
217	+++			+++	+++	+++		+++
224	+++			+++	+++	+++		
231				+++	+++	+++		
238				+++	+++	+++		
245				+++	+++			
252				+++				
259				+++				
266				+++				
273				+++				

Tabela 8.

Valores da Percentagem de Células do Doador (ACI) em Sangue

GROUP E1	<u>Periférico de Animais do Grupo E1</u>		
	30° PO	65° PO	95° PO
Rato 1	3	*	18.3
Rato 2	9.1	13.1	24.4
Rato 3	7.2	12.5	*
Rato 4	4.4	9.7	19.4
Rato 5	3.9	7.9	21.4
Rato 6	6.1	14.7	26.9
MD	5.61666667	11.58	22.08
DP	2.286846446	2.737151804	3.554855834

* Exame com erro técnico ou não realizado

Tabela 9

Valores da Percentagem de Células do Doador (ACI) em Sangue

Periférico de Animais do Grupo E2

GROUP E2	30° PO	65° PO	95° PO	120° PO	160° PO	200° PO
Rato 1	8.4	14.7	18.7	19.6	23.9	36.4
Rato 2	4.2	9.5	19.8	24	32.6	*
Rato 3	7.1	12.6	23.4	26.3	*	40.1
Rato 4	5.9	15.4	21.2	20.4	23.2	29
Rato 5	3.9	*	17.9	21.4	22.5	30.4
Rato 6	*	16.6	22.1	25.6	*	35.5
Rato 7	9.3	14.5	21.05	*	26.4	*
Rato 8	6.6	13.9	20.4	24.8	*	37.3
MD	6.4857143	13.885714	20.56875	23.171429	25.66	34.783333
DP	2.0095012	2.2945069	1.7818404	2.6700276	3.9928686	4.2517839

* Exame com erro técnico ou não realizado

Tabela 10

Citocinas em Linfonodo Cervical

GRUPO E1						
	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	INF-G %	TNF-A %
Rato 1	0.026817548	0.000465044	0.693768408	0.70136413	0.594907766	0.82599597
Rato 2	0.055598094	0.000255232	1.120512166	0.593415008	0.320486643	0.298664284
Rato 3	0.012232292	0.00036575	0.483683505	0.625594343	0.243548584	0.488925915
Rato 4	0.012886969	0.000791937	1.678185745	0.908063355	0.429085673	0.352051836
Rato 5	0.062888654	0.000234659	0.68512652	0.49032031	0.26187962	0.360201807
Rato 6	0.023640978	0.000400695	0.66648858	0.629936334	0.235964561	0.667334491
MD	0.0323441	0.0004189	0.8879608	0.6581156	0.3476455	0.4988624
DP	0.0217397	0.0002026	0.4404266	0.1403834	0.1408356	0.208018
GRUPO C1						
	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	INF-G %	TNF-A %
Rato 1	0.060560182	0.000425814	0.015187358	0.027157456	0.016180924	0.029381151
Rato 2	0.015757892	0.000191321	0.010592225	0.004156883	0.019253848	0.02513262
Rato 3	0.037450985	0.000164362	0.011787081	0.016764892	0.007091033	0.047242246
Rato 4	0.027115282	0.000120942	0.010860626	0.014900102	0.011005757	0.026558947
Rato 5	0.015130526	0.00016192	0.007574258	0.011514312	0.008257921	0.038303078
Rato 6	0.015908948	0.000209604	0.01653776	0.005282022	0.015175334	0.014064432
MD	0.028654	0.0002123	0.0120899	0.0132959	0.0128275	0.0301137
DP	0.017941	0.0001088	0.0032746	0.0084578	0.0047992	0.0114544
E1 X C1	P>0.05	P>0.05	P<0.002	P<0.002	P<0.002	P<0.002

Tabela 11

Citocinas em Língua

GRUPO E1

	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	IFN-G%	TNF-A %
Rato 1	0.005326107	0.000560643	0.488787143	0.956269856	0.93758176	0.759390768
Rato 2	0.017008611	0.000956734	0.415222706	0.612628893	0.799404699	0.766769427
Rato 3	0.004287705	0.000428771	0.971486762	0.971486762	0.367349126	0.423089291
Rato 4	0.00380421	0.000760842	0.359117423	0.363175247	0.768450418	0.175247274
Rato 5	0.013203714	0.000145096	0.388566454	0.920052234	0.90684852	0.82980267
Rato 6	0.001205442	0.000602721	0.253573274	0.155071465	0.33149647	0.679438609
MD	0.0074726	0.0005758	0.479459	0.6631141	0.6851885	0.605623
DP	0.0061849	0.0002784	0.2530109	0.3457371	0.2679303	0.2545034

GRUPO C1

	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	IFN-G%	TNF-A %
Rato 1	0.002222105	0.000423258	0.003756415	0.016401249	0	0.016930321
Rato 2	0.002478929	0.000495786	0.016360932	0.010659395	0	0.025780863
Rato 3	0.001160611	8.92777E-05	0.010445496	0.019194715	0.000624944	0.018034104
Rato 4	0.001797268	0.000279575	0.003754293	0.00821	0.000399393	0.016415049
Rato 5	0.001483201	0.000580383	0.005029986	0.026181724	0	0.01463855
Rato 6	0.002173598	0.000144907	0.004419649	0.02238806	0	0.004999275
MD	0.001886	0.0003355	0.0072945	0.0171725	0.0001707	0.016133
DP	0.0004987	0.0001967	0.0051102	0.0068673	0.0002739	0.0066874

E1 X C1	P>0.05	P>0.05	P<0.002	P<0.002	P<0.002	P<0.002
----------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Citocinas em Intestino do Receptor

E1 X C1

Tabela 13.

Citocinas no Enxerto de Intestino

GRUPO E1						
	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	INF-G %	TNF-A %
Rato 1	0.00687	0.000136196	0.013869342	0.00969	0.00249	0.02558224
Rato 2	0.00298	0.000142279	0.006355128	0.00298	0.00104	0.012615404
Rato 3	0.00738	0.000158284	0.003675695	0.0058	0.00117	0.035719311
Rato 4	0.00354	0.000148542	0.005161817	0.00681	0.00358	0.091371595
Rato 5	0.00746	0.00019354	0.006214786	0.04178	0.029	0.019397015
Rato 6	0.01383	0.000129547	0.013055432	0.01937	0.01164	0.045873937
MD	0.00701	0.0001514	0.0080554	0.014405	0.0081533	0.0384266
DP	0.0038769	2.291E-05	0.0043043	0.0145501	0.0109462	0.0284931
GRUPO C1						
	IL-2 %	IL-4 %	IL-6 %	IL-10 %	INF-G %	TNF-A %
Rato 1	0.02582	0.000192493	0.017656838	0.02005	0.00909	0.030868842
Rato 2	0.00908	9.58069E-05	0.004630665	0.03524	0.01328	0.033915626
Rato 3	0.00838	0.000162522	0.011121172	0.0168	0.00694	0.012049871
Rato 4	0.007217	0.000139995	0.007892204	0.0041	0.004129845	0.028401435
Rato 5	0.00243	9.58069E-05	0.008047776	0.001745	0.006387124	0.012965861
Rato 6	0.01021	0.000208957	0.006733069	0.01098	0.010192473	0.020942165
MD	0.011184	0.0001493	0.009347	0.0148192	0.0083366	0.0231906
DP	0.008719	4.777E-05	0.0045844	0.0122382	0.0032217	0.0093258
E1 X C1	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

Tabela 14

Cultura Mista de Linfócito de LEW Normal

Rato#	LEWXLEW				LEWXACI				LEWXPVG				LEWXMED			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CPM	978	2850.3	1341	1453	13664	8834	11091	9840	7497	17453	9217	12512	1880	2059	789	567
MD	1656				10857				11670				1324			
DP	822				2087				4381				755			

Cultura Mista de Linfócito de LEW do Grupo E2

Rato#	E2 X LEW				E2 X ACI				E2 X PVD				E2 X MED			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CPM	3922	2135.4	1509	4140	3166	1570	1307	2902	12460	7078	8921	14124	1910	736	1021	1221
MD	2926				2236				10646				1222			
DP	1304				933.7				3219				500			

CPM - Contagem por minuto

MD - Média

DP - Desvio padrão