

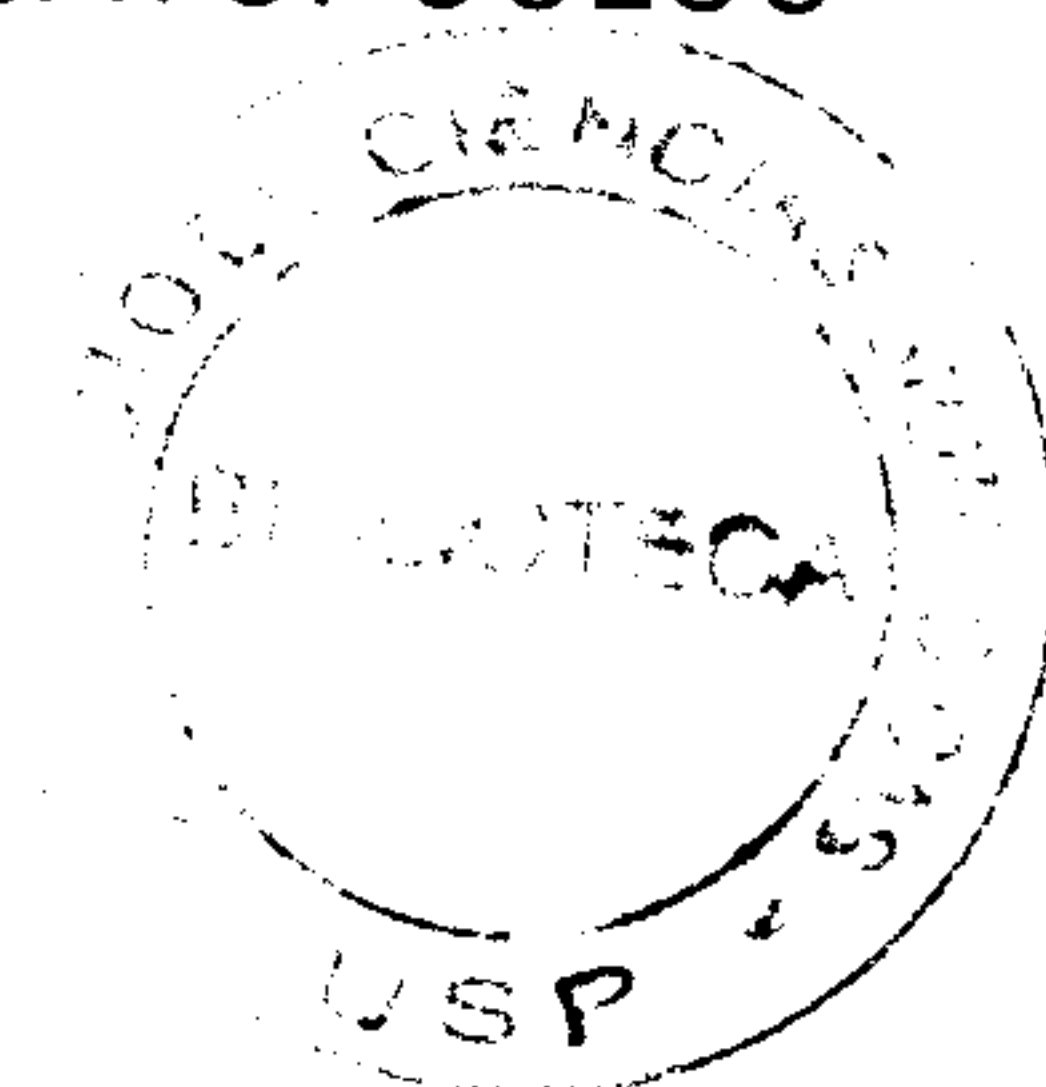
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**O MICROQUIMERISMO E A IMPORTÂNCIA
DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA
DO DOADOR SEMI-ALOGÊNICO NA
SOBREVIVÊNCIA DO ENXERTO**

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

LUCIANA DE DEUS VIEIRA DE MORAES
ORIENTADOR: DR. LUIZ VICENTE RIZZO
CO-ORIENTADOR: DR. NICOLAS PANAJATOPOULOS

SÃO PAULO
2003



Candidato(a): Luciana de Deus Vieira de Moraes

Título da Tese: A importância das células da medula óssea do doador semi-alogênico no aumento da sobrevivência do enxerto: aspecto não associado ao microquimerismo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 17/4/03, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

Reprovado(a)

1) Examinador(a)

Inambertin

2) Examinador(a)

Maria Luiza de Lima

3) Examinador(a)

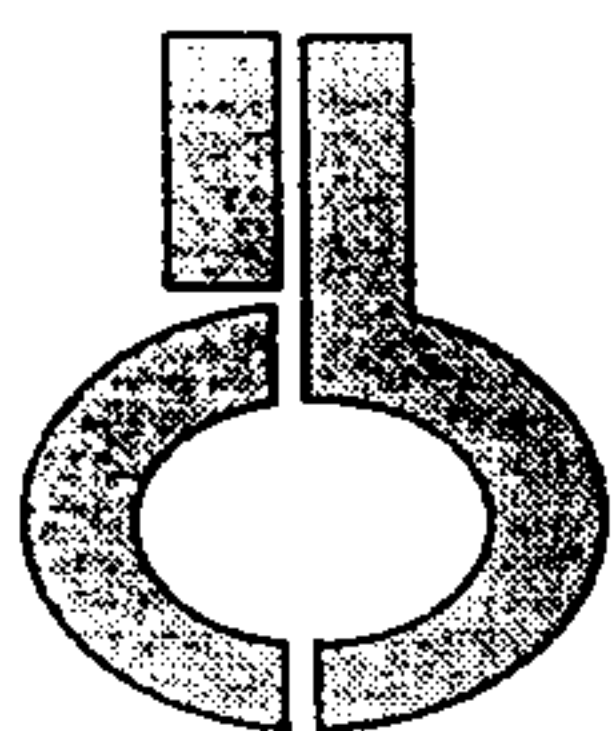
[Assinatura]

4) Examinador(a)

Luiz Guilherme Guglielmi

5) Presidente

[Assinatura]



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

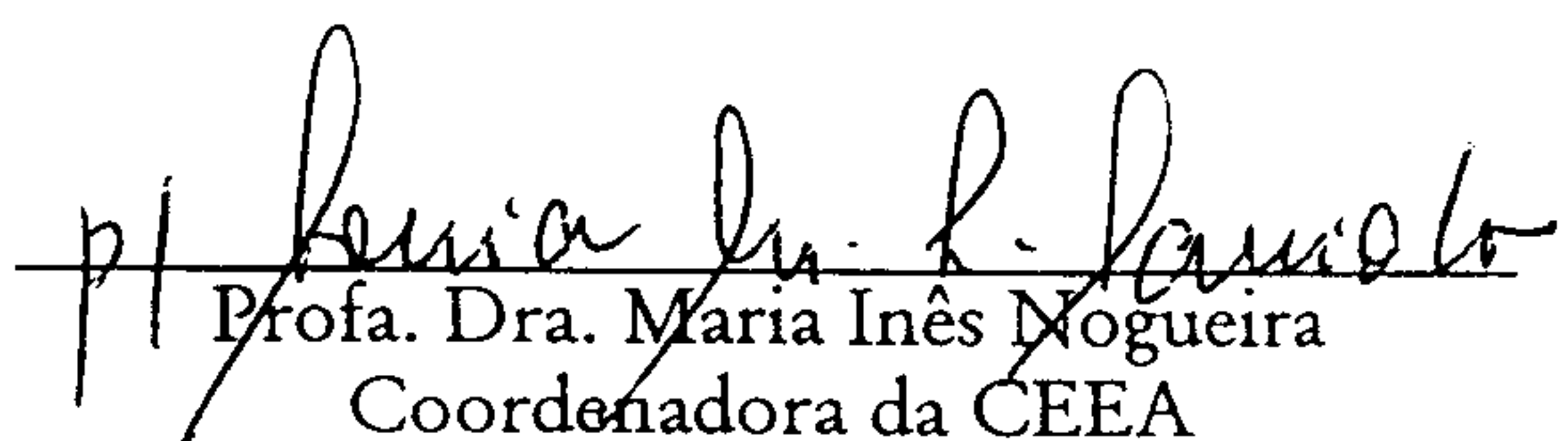
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

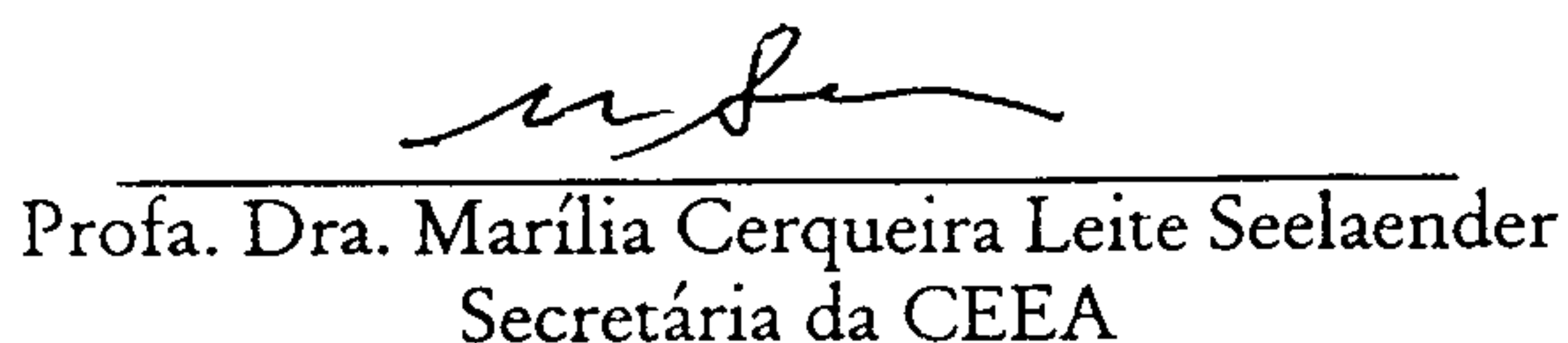
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 197/2001, sobre o projeto intitulado “ A importância do microquimerismo na indução da tolerância ao enxerto semi-alogênico”, sob a responsabilidade de Luiz Vicente Rizzo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 21/02/2002.

(We certify that the protocol nº 197/2001 about “ *The role of microchimerism in tolerance induction to semi-allogeneic grafts*” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 21/02/2002 meeting.)

São Paulo, 21 de fevereiro de 2002.


Prof. Dra. Maria Inês Nogueira
Coordenadora da CEEA


Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

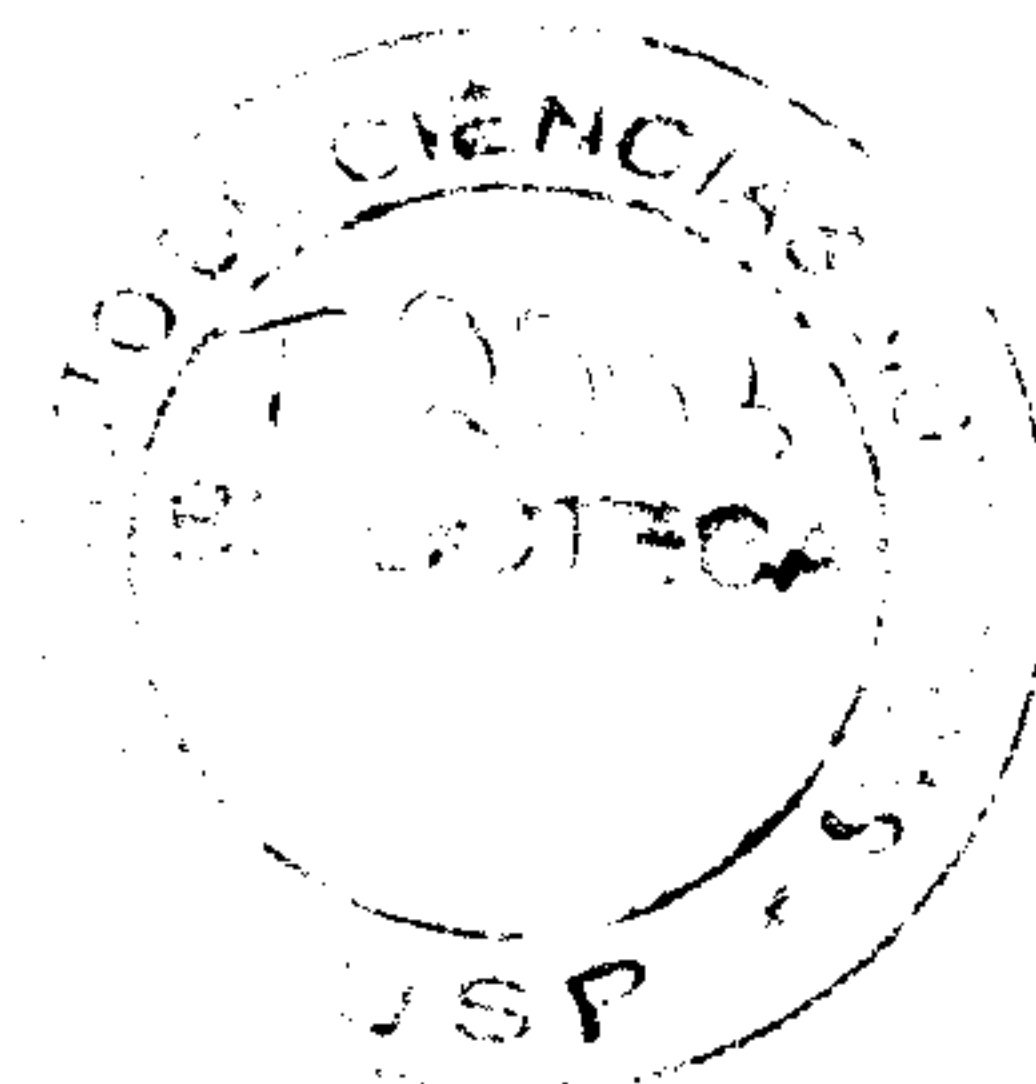
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**O MICROQUIMERISMO E A IMPORTÂNCIA
DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA
DO DOADOR SEMI-ALOGÊNICO NA
SOBREVIVÊNCIA DO ENXERTO**

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

LUCIANA DE DEUS VIEIRA DE MORAES
ORIENTADOR: DR. LUIZ VICENTE RIZZO
CO-ORIENTADOR: DR. NICOLAS PANAJATOPOULOS

SÃO PAULO
2003



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

T-ICB
BMI
M827m
2003

de Moraes, Luciana de Deus Vieira

O microquimerismo e a importância das células da medula óssea do doador semi-alogênico na sobrevivência do enxerto / Luciana de Deus Vieira de Moraes. -- São Paulo, 2003.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia.

Área de concentração: Imunologia.

Linha de pesquisa: Imunologia de transplantes.

Orientador: Rizzo, Luiz Vicente.

Versão do título para o inglês: Microchimerism and the importance of semi-allogeneic donor-derived bone marrow cells in graft survival.

Descritores: 1. Microquimerismo 2. Rejeição 3. Medula óssea 4. Baço 5. IL-10 6. Moléculas co-estimuladoras

ICB/SBIB001/2003

UM PEQUENO MEMORIAL E AGRADECIMENTOS

Meu ingresso no "mundo dos transplantes" iniciou-se há 4 anos quando participei de um grupo que desenvolvia estudos nessa área no *Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri*, em Bérgamo, na Itália. O convite veio intermediado pelo Dr. Nicolas Panajatopoulos, que desenvolve pesquisa em transplante já bastante tempo faz. Durante a minha permanência na Itália, pude desenvolver uma série de potenciais, dentre eles, a língua, o paladar, a convivência e a vivência científica. Foi muito enriquecedor, principalmente porque se tornou mais um referencial importante na minha trajetória. Ao retornar ao Brasil ingressei no laboratório do Professor Luiz Vicente Rizzo, orientador do atual estudo, junto à co-orientação do Nicolas. Aproveito para agradecê-los pelo projeto, pela orientação e participação no desenvolvimento do trabalho. O projeto inicial atribuía considerável responsabilidade às células do doador semi histo-incompatível na indução da tolerância ao enxerto; partindo-se dessa premissa, a idéia seria estudar as células envolvidas no fenômeno. Como a dinâmica do processo científico nem sempre é previsível, assim como não existe "regra de três" em imunologia, os resultados indicaram outro rumo, muito diferente do esperado. Aliado a esse aspecto, padronizações e métodos que nem sempre dão certo (como é do conhecimento da maioria) também entraram no meio do caminho, como a pedra de Drummond. Traços de Polliana Moça nesse discurso à parte, mas muito se aproveita desses desvios inesperados: a vivência - naquilo que deu certo ou que deu errado - e a conseqüente experiência; a curiosidade (gostaria muito de saber por quê não funcionou) e uma das molas propulsoras da ciência e da vida: vencer desafios. A minha amiga Rosely diz que a gente sempre sai com aquela frase: (...) "o importante é a experiência"(...).

No laboratório do Rizzo tive oportunidade de participar de vários outros projetos: algo que me era sempre lembrado desde a época em que eu fazia mestrado. As colaborações estabelecidas foram (e ainda vão) em áreas diversas da imunologia e foram

possíveis também porque o chefe do laboratório sempre as apoiou. O ambiente se tornou muito agradável, divertido e produtivo. Rizzo, agradeço-lhe por isso.

Durante a execução dos experimentos, conheci a Dra. Valquíria Bueno quando veio ao Departamento, a convite, para falar sobre o seu trabalho. Aproveitei seu conhecimento (de anos) em transplantes para mostrar-lhe os enxertos de pele que eu havia começado a realizar. A partir daí iniciou-se uma colaboração muito produtiva, apoiada na generosidade, cumplicidade e disponibilidade que a Valquíria sempre demonstrou. Além de uma grande amiga. Muito obrigada!

Momentos importantes e que acrescentaram foram muitos. Acredito que a consciência do que é ciência e de como fazê-la é algo que estamos procurando amadurecer. Uma sábia voz sempre me dizia: "Preste atenção no fenômeno!! Você pode partir dele para chegar no mecanismo mas nunca se parte do mecanismo para alcançar o fenômeno!!". Eu confesso que demorei um pouco para começar a entender essa frase. E não porque a tivesse ignorado. Lindamente, o seguinte fato ilustra tão bem o supra citado:

Na curiosidade em se saber qual seria o linfonodo drenante da pele que é enxertada no dorso do camundongo, foi-me sugerida, pelo Dr. Gustavo Amarante-Mendes, a utilização do corante azul de Evans. A injeção desse corante pela via subcutânea é suficiente para provocar uma inflamação local e conseqüentemente, dentre outros eventos, extravasamento de albumina, explicou-me Dr. Tadokoro - o Kadu - aluno de pós-doutorado do laboratório. Curioso, tanto quanto eu, Kadu providenciou de imediato o corante; programou o experimento e começamos a procurar o tal linfonodo em intervalos regulares. Encontramos o linfonodo drenante praticamente de imediato, e cada vez que se sacrificava um camundongo, maior era a gana em se perseguir o líquido azul. Para a nossa surpresa, vinte e quatro horas após, o timo tinha se tornado ligeiramente azulado. O timo??? Aquela....sei lá, entidade?? A eficiência da barreira hemato-encefálica aliviou o Guilherme - aluno de iniciação científica do laboratório - quando ele abriu a cabeça do pobre murino e viu que essa não estava azul. Muitas perguntas surgiram a partir desse experimento tão simples. Mas eu ainda não sei porque o timo ficou azul.

Não posso prolongar-me muito mais pois uma tese o espera, prezado leitor. Gostaria, ainda, de agradecer às pessoas que participaram direta ou indiretamente desse trabalho; àquelas que estavam presentes e que fizeram parte do meu convívio.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos companheiros do laboratório: À Adriana Lima Vallochi, pelo apoio, discussão de resultados e principalmente pela grande participação nos experimentos nessa fase final; ao Kadu, pela cumplicidade, pela interlocução e pelas discussões científicas; à Gislaine Martins, pela sua contribuição científica no período em que ficou no nosso lab e pelas orientações durante o caminho; ao Guilherme Lopes Yamamoto, pela sua participação e por ter me dado a chance de aprender a orientá-lo; ao Ulisses Rodrigues da Silva, pelo suporte técnico, por me socorrer em assuntos de informática e, principalmente, pelas inúmeras irradiações de células do doador, a 3000 rads e ao Ademir Veras da Silva, que também irradiou células quando precisei; à Andrea Martin, por todo o auxílio e disponibilidade durante a sua permanência no lab; às alunas de iniciação científica - Roberta e Sandra -pela participação; à Gisele Baracho e ao Axel Ulbrich pelos experimentos pilotos de biologia molecular; ao Paolo Ruggero Errante por ter me ensinado a técnica de transplante de pele; à Lília Rios pela disponibilidade e interlocução; ao Ricardo Weinlich pela orientação nas análises das PCR, pela sua solidariedade e cumplicidade; à Alessandra Commodaro por todo o apoio e à Leandra Bernusso pelo suporte técnico.

Aos Profs. José Orivaldo Mengele - pela participação no Exame de Qualificação e por indicar um caminho importante nesse estudo - e Anna Carla Goldberg, também pela sua participação na Banca de Qualificação e pela sua disponibilidade em orientar a redação da tese: meus sinceros agradecimentos. Agradeço também ao Prof. Magnus Gidlund.

Ao Prof. João Gustavo Amarante-Mendes, pela discussão de alguns resultados e por sugerir alguns experimentos; ao Paulo Albe, pela competência nos cortes histológicos e pela atenção.

Um agradecimento especial quero fazer também às secretárias do Departamento - Valéria dos Santos e Jotelma Ribeiro -, pelo grande suporte burocrático, pela competência, paciência e afetividade; à Thaís Marques pelo fornecimento dos camundongos e à Sílvia Massironi por todo o auxílio no biotério de experimentação e pela sua generosidade; À Eva Oliveira pela assistência na elaboração da ficha catalográfica.

Quero ainda dizer "muito obrigada" ao Orlando Ribeiro (Instituto Butantan) pelos experimentos iniciais com as células de medula óssea, pela sua disponibilidade e troca de idéias; ao meu irmão Rodrigo, pela sua "se precisares de mim é só chamar", revisão de texto e digitação de parte da bibliografia.

Às minhas avós queridas - Maria e Zilah – pela contribuição cultural na minha formação, pela presença constante e por todo o afeto.

Aos meus pais, pelo referencial que representam e pelo enriquecimento intelectual e afetivo; por todo o apoio em tudo que sempre desejei realizar: meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu Norte e Sul - Osvaldo Augusto, meu marido - por tudo que me mostrou e ensinou; pela sua preocupação com o intelecto, a cultura, a ética, o coletivo, o correto; pela sua visão tão simples e ao mesmo tempo complexa da ciência; pelo precioso referencial que se tomou em minha vida.

À FAPESP agradeço a oportunidade de desenvolver-me cientificamente e de contribuir para o conhecimento.

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia do ICB/USP com auxílio financeiro da FAPESP (bolsa Doutorado # 00/03279-6 e Projeto Temático # 98/11205-0); reflete a dinâmica do conhecimento científico, sendo que o título originalmente proposto – *A importância do microquimerismo na indução da tolerância ao enxerto semi-alogênico* - foi modificado, adequando-se aos resultados alcançados.

ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígenos
CPM	Contagens por minuto
FACS	Citometria de fluxo
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MLR	Cultura leucocitária mista
NK	<i>Natural killer</i>
Th	Linfócito T auxiliar

RESUMO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. O microquimerismo	5
1.1.1. Tolerância através da promoção de quimeras de medula óssea em receptores irradiados	8
1.1.2. Tolerância induzida através da administração de células do doador em receptores não irradiados	9
1.2. O envolvimento do timo na tolerância aos aloantígenos	12
1.3. O enxerto	14
1.4. Alguns dos mecanismos envolvidos na rejeição/tolerância do aloenxerto	16
1.5. O paradigma Th1/Th2 na rejeição de aloenxertos ou tolerância aos mesmos	21
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais de experimentação	27
3.2. Abordagem experimental	27
3.3. Isolamento e preparação das células do doador	28
3.4. Cultura leucocitária mista	29
3.5. Citometria de fluxo	30
3.6. Análise do microquimerismo por PCR	31
3.7. Análise das citocinas	32
3.8. Transplante de pele	34
3.9. Transplante cardíaco	34
4.0. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Avaliação do tempo de sobrevivência do enxerto após a administração de células do baço com as da medula óssea do doador (BALB/c x C56BI/6)F1 vinte e um dias antes do transplante	36

4.1.1. Efeito no transplante de pele.....	36
4.1.2. Efeito no transplante cardíaco.....	38
4.2. Avaliação do microquimerismo em camundongos transplantados após a infusão das células semi-alogênicas do baço junto com as da medula óssea.....	40
4.3. Estudo dos mecanismos envolvidos na rejeição diferencial do enxerto de pele, transplantada após a inoculação das células do doador.....	43
4.3.1. Fenotipagem das células do doador (BALB/c x C57Bl/6)F1.....	43
4.3.2. Avaliação das populações celulares e da expressão das moléculas CD28 e CD40L nos camundongos transplantados após a injeção das células do doador.....	46
4.3.2.1. Avaliação das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e B220 ⁺	46
4.3.2.2. Avaliação da expressão das moléculas CD28 e CD40L nas células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	49
4.3.3. Avaliação da resposta proliferativa das células de camundongos transplantados após a administração das células semi-alogênicas.	52
4.3.4. Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura mista das células do baço de animais transplantados.....	54
4.4. Estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na reatividade às células semi-alogênicas na ausência do transplante.....	57
4.4.1. Estabelecimento do microquimerismo.....	57
4.4.2. Avaliação das populações celulares e da expressão de moléculas de ativação das células T do receptor em diferentes tempos após a infusão das células semi-alogênicas.....	62
4.4.2.1. Avaliação do número de células totais do baço.....	62
4.4.2.2. Avaliação das populações de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	65
4.4.2.3. Avaliação da população de células T CD4 ⁺ CD28 ⁺ e T CD8 ⁺ CD28 ⁺	68
4.4.2.4. Avaliação da população de células T CD4 ⁺ CD40L ⁺ e T CD8 ⁺ CD40L ⁺	71
4.4.2.5. Avaliação da população B220 ⁺	74
4.4.3. Avaliação da resposta proliferativa das células de baço de camundongos normais frente às células semi-alogênicas da medula óssea.....	76
5. DISCUSSÃO.....	79

6. CONCLUSÕES.....94

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....96

RESUMO

A indução de tolerância ao enxerto através da administração de células do doador, em períodos que antecedem o transplante, tem se demonstrado eficiente, mesmo em receptores não imunossuprimidos. Os dados da literatura científica são conflitantes quanto ao vínculo entre o microquimerismo e a tolerância aos aloantígenos. No presente estudo, observou-se que a infusão da mistura de células do baço com as da medula óssea, provenientes do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁, vinte e um dias antes do transplante, resultou em aumento do tempo de sobrevivência dos enxertos de pele e cardíaco, em parentais BALB/c, principalmente quando comparado ao grupo de animais que receberam somente as células do baço do mesmo doador. Assim, procurou-se investigar o estabelecimento do microquimerismo, sua relação com o aumento do tempo de sobrevivência do enxerto e possíveis mecanismos envolvidos. Observou-se um aumento de IL-10 no sobrenadante de cultura das células esplênicas provenientes de animais inoculados com a suspensão mista de células. Em contrapartida, os camundongos que receberam apenas as células do baço apresentaram um aumento da população de linfócitos B. Verificou-se, ainda, que o desenvolvimento de microquimerismo estável não se correlacionou com a tolerância ao enxerto cardíaco, apesar do tempo de sobrevivência do órgão. Esses resultados sugerem que a IL-10 participa no aumento da sobrevivência do mesmo quando células do baço com as da medula óssea do doador são administradas antes do transplante.

SUMMARY

Tolerance induction to allografts by the administration of donor cells before transplantation has been shown to be efficient, even in non immunosuppressed hosts. There are conflicting reports in the literature regarding the role of microchimerism and tolerance to alloantigens. In the present work, augmentation of skin and cardiac survival time was observed after the infusion of a mixture of donor (BALB/c x C57Bl/6)F₁ spleen and bone marrow cells twenty-one days before transplantation, specially when compared to donor spleen cell receptors. The establishment of microchimerism, correlation with graft survival time and possible mechanisms involved in this strategy were investigated. An overproduction of IL-10 in the supernatants from spleen cell cultures of mice inoculated with semi-allogeneic cells was observed. Mice that received donor spleen cells only showed increased number of B lymphocytes. Moreover, the establishment of microchimerism did not correlate to tolerance to cardiac allografts despite the augmentation of graft survival time. These results suggest that the development of microchimerism does not prevent graft rejection and that there is a role for IL-10 in graft survival when donor spleen and bone marrow cells are infused before transplantation.

(...) “Se enxertarmos a pele de um camundongo adulto prêto, *P*, em um camundongo adulto branco, *B*, após cêrca de 10 dias o enxêrto é eliminado, em consequênciã da formaçã de anti-*P*; 2) O animal *B*, que eliminou o primeiro enxêrto, eliminarã mais ràpidamente enxêrtos subseqüentes (estímulo secundário). O mesmo acontece se *B* fôr prêviamente imunizado com extratos de órgãos (pele, rim, baço) de *P*; 3) Se, porém, *B* fôr injetado in utero (ou logo após o nascimento) com extrato de órgãos de *P*, ao atingir a idade adulta, tolerará o enxêrto de *P* pois será incapaz de formar anti-*P*; 4) Tal estado de tolerância adquirida desaparece se o animal tolerante for injetado com células imunologicamente competentes *B*, e. g., com uma suspensão de gânglios linfáticos ou baço de um camundongo *B* adulto normal “(...). Trecho reproduzido do livro *Bacteriologia e Imunologia* de Otto Bier, edição de 1965, referente aos experimentos de Medawar, Billingham e Brent, publicados na Revista *Nature* há exatos 50 anos.

1. INTRODUÇÃO

O transplante de órgão tem sido uma estratégia bem sucedida no aumento do tempo de sobrevivência do paciente oferecendo melhor qualidade de vida quando se trata da falência do mesmo. Se por um lado existe a possibilidade técnica da substituição do órgão, sua manutenção requer o uso de drogas imunossupressoras que podem gerar efeitos colaterais indesejáveis, como o desenvolvimento de hipercolesterolemia, diabetes e infecções oportunistas (revisado em ADLER & TURKA, 2002) além de não evitar a rejeição crônica. Em vista das conseqüências provocadas pela administração de fármacos, têm sido inúmeras as intervenções no sistema imunológico com o intuito de prevenir a reatividade específica ao órgão enxertado. Segundo o axioma estabelecido no campo de transplantação, a indução da tolerância ao transplante poderia eliminar a rejeição crônica e o uso de drogas imunossupressoras.

Há 50 anos, o fenômeno da tolerância imunológica adquirida foi relatado, quando Medawar, Billingham e Brent realizavam experiências de enxertos de pele entre animais da mesma espécie, após a administração de células do doador *in útero* (BILLINGHAM et al., 1953). Os mecanismos básicos envolvidos nesse processo estão sendo cada vez mais elucidados. Esses mecanismos compreendem a deleção ou inativação clonal de células potencialmente aloreativas, no timo, e/ou a deleção, inativação ou regulação destas células na periferia. A compreensão desses eventos pode ter um efeito considerável no prolongamento e nas melhores condições de vida de pacientes que necessitam de transplante, e que são submetidos a um regime prolongado de imunossupressores, os quais não previnem a rejeição crônica, a principal causa da perda dos enxertos a longo prazo. Além disso, estas drogas, sendo inespecíficas, colocam os pacientes sob o risco de desenvolverem infecções e tumores.

A indução de tolerância ao transplante, ao invés da imunossupressão pelo uso de drogas, é uma alternativa que consiste em modular o sistema imune fazendo com que este se torne não agressivo aos antígenos do tecido enxertado. A observação de indivíduos que tiveram suspensão da terapia imunossupressora devido à toxicidade, e que mantiveram o enxerto funcionando, confirma que a tolerância também pode ser adquirida no homem (REYES et al., 1993).

Os resultados dos experimentos de BILLINGHAM et al. (1953), levou à investigação dos possíveis mecanismos envolvidos e à interpretação de que a tolerância neonatal experimental ocorre, principalmente, por seleção negativa da mesma maneira que a tolerância ao próprio. Como estes neonatos têm poucas células T maduras, têm sido proposto que essas não seriam capazes de rejeitar as células do doador as quais poderiam, posteriormente, circular pelo timo conduzindo a um estado de tolerância por eliminação dos clones potencialmente aloreativos (MORRISSEY et al., 1983).

1.1. O microquimerismo

Em 1969, KASHIWAGI e cols. descreveram, em transplantados hepáticos humanos que apresentavam um tempo prolongado de sobrevivência do enxerto, um fenômeno referente ao fluxo migratório dos leucócitos do doador para fora do enxerto e reposição do sistema fagocitário, inclusive as células de Kupffer, conjuntamente às células do recipiente. Este estado de microquimerismo foi novamente demonstrado em pacientes clinicamente estáveis muitos anos após o transplante de fígado, quando da detecção das células hematopoiéticas do doador, denominadas leucócitos passageiros, na periferia (STARZL et al, 1992). Outras evidências sobre o estabelecimento do microquimerismo vêm das observações em ratos de que as células que deixaram o

enxerto hepático, nidaram em órgãos linfóides ou em tecidos não linfóides (DEMETRIS et al., 1992).

Estudos subseqüentes mostraram que as células do doador podem colonizar o sangue periférico, os linfonodos, a pele, o intestino, a medula óssea e o timo do receptor. Além disso, o microquimerismo não ocorre somente nos transplantados hepáticos; pode ser observado nos receptores de rim, coração e pulmão (revisado por REMUZZI, 1998). SUBERBIELLE et al. (1994) observaram microquimerismo no sangue periférico e na pele de transplantados renais com longo tempo de sobrevida. A persistência das células do doador em receptores tolerantes sugere que essas apresentam função relevante nesse processo. As observações de MCSHERRY et al. (1996) permitiram associar o grau de desenvolvimento de microquimerismo com a funcionalidade do enxerto pulmonar. Embora essas evidências demonstrem a co-existência de ambos fenômenos – persistência das células do doador e aceitação do enxerto – ainda não está claro se o microquimerismo é causa ou conseqüência da tolerância ao enxerto.

Os estudos de KO e cols. (1999) demonstraram o efeito imunomodulatório dos leucócitos passageiros do enxerto na indução da aceitação. Evidenciou-se que a depleção das células hematopoiéticas do doador, através do anticorpo que reconhece as isoformas do CD45 presentes nos leucócitos do doador, no mesmo dia em que foi realizado o transplante, levou à rejeição do enxerto cardíaco em ratos. A depleção tardia dessas células não alterou o estado de tolerância induzida pelo tratamento com ciclosporina, sugerindo que o efeito modulatório é importante na fase inicial (afereente da resposta imune anti-aloantígenos), pós-enxerto. Outros estudos mostraram que o desaparecimento do microquimerismo no timo era precedido pela rejeição do enxerto, em modelo de transplante cardíaco realizado 10 dias após a administração de células

esplênicas do doador. Esses resultados indicam que o desaparecimento do microquimerismo no timo é responsável pela resposta aloreativa nesse órgão (OTA et al., 1999).

Uma das estratégias de indução de tolerância ao aloenxerto é a administração de células do doador, em receptores imunossuprimidos ou não, anterior e concomitante, ou até mesmo após o transplante. Vários estudos mostraram o sucesso dessa estratégia com diferentes populações celulares, como as de baço (YANG et al., 1998; MORITA et al., 1998; OTA et al., 1999; GOLDSTEIN et al., 2000), com ou sem as da medula óssea (ETO et al., 1990; ETO et al., 1990a; UMEMURA et al., 2000; MATHEW et al., 2000), concomitantemente às do sangue periférico (NORIS et al., 1999), ou ainda com células dendríticas imaturas (LU et al., 1999).

Apesar do grande número de estudos, a natureza da célula do doador implicada neste processo ainda não foi bem elucidada. UMEMURA et al. (2000) demonstraram a importância das moléculas MHC de classe II das células da medula óssea na tolerância ao aloenxerto, administradas no 7º dia após o transplante de pele em camundongos tratados com rapamicina e soro anti-*linfocitário*. Esse fenômeno não foi verificado quando as células de camundongos deficientes nessa molécula eram infundidas. A importância de MHC classe II na indução de tolerância ao enxerto renal também foi demonstrada em recipientes tratados com um ciclo curto de ciclosporina (NORIS et al., 2001). A depleção dessas moléculas nas células do sangue periférico do doador, infundidas 10 dias antes do transplante, reduziu o tempo de sobrevivência do transplante.

Os estudos de ETO e cols. (2002) demonstraram o efeito tolerogênico das células dendríticas imaturas do doador, mobilizadas após o tratamento *in vivo* com o ligante do Flt3 (FL). Nesse protocolo, a infusão de células esplênicas provenientes de doador

tratado com o FL, seguida da administração de células da medula óssea 14 dias antes do transplante, foi eficaz para a sobrevivência do enxerto de pele em camundongos receptores tratados com ciclofosfamida e busulfan.

Apesar das inúmeras evidências que associam a sobrevivência do enxerto com o microquimerismo, a relevância clínica desse fenômeno é muito discutida. Na clínica, a observação da aquisição da tolerância ao órgão sólido sem o estabelecimento do microquimerismo (SCHLITT et al., 1994a; HIRANAGA et al., 1996; ISHIDA et al., 1996), evidencia que não existe necessariamente uma relação entre aceitação do enxerto e presença das células do doador. DONAHUE et al. (2001) demonstraram que camundongos que receberam células alogênicas sca+ da medula óssea na fase uterina, rejeitaram a pele transplantada de forma acelerada, ainda que tenha havido desenvolvimento de microquimerismo estável.

As estratégias de indução de tolerância que empregam infusão das células do doador podem ser caracterizadas em dois grupos: 1– tolerância através da promoção de quimeras de medula óssea em receptores irradiados; 2– tolerância induzida em receptores não irradiados.

1.1.1. Tolerância através da promoção de quimeras de medula óssea em receptores irradiados.

A primeira estratégia de indução de tolerância consistiu em destruir o sistema hematopoiético do recipiente através de doses letais de irradiação, recompondo-o com células da medula óssea provenientes de doador alogênico (WEKERLE & SYKES, 1999). Apesar do sucesso na aceitação do transplante, esse condicionamento tem sido acompanhado de toxicidade, envolvendo o risco de desenvolvimento de doença do

enxerto contra o hospedeiro (GVHD) e dificultando sua aplicação clínica (WEKERLE & SYKES, 1999).

Estudos recentes sugerem que o uso de doses sub-letais de irradiação, seguidas da reconstituição com células da medula óssea do doador, permitem a aceitação dos enxertos de pele e cardíaco em animais (WEKERLE & SYKES, 1999; UMEMURA et al., 2000).

A importância da célula T do doador na aceitação do enxerto alogênico foi exposta em camundongos sub-letalmente irradiados, reconstituídos com as células da medula óssea de animais deficientes em células T CD4 ou CD8, ou ambas, inclusive quanto às células *natural killer* (NK) (MONACO et al., 2001). Nesse modelo, os animais foram incapazes de aceitar o transplante de pele do doador alogênico selvagem, apesar do estabelecimento do quimerismo. Nesses recipientes, a tolerância ao enxerto foi observada somente após a infusão de células T provenientes de camundongos imunocompetentes, portando o MHC compatível ao do doador.

1.1.2. Tolerância induzida através da administração de células do doador em receptores não irradiados.

Na década de 70, Monaco e cols. (revisado em MONACO et al., 2001) demonstraram que a infusão das células alogênicas da medula óssea após o transplante, em camundongos tratados com soro policlonal anti-linfocitário, induziu tolerância ao enxerto. Esses experimentos revelaram que era possível atingir esta meta sem o uso de irradiação. No transplante clínico, a utilização do soro anti-linfocitário e a administração de célula da medula óssea do doador contribuíram para o aumento do tempo de sobrevivência do enxerto renal (BARBER et al., 1991). A infusão repetida de células da medula óssea, após o transplante em recipientes tratados com o anticorpo

anti-linfocitário, prolongou a sobrevivência do enxerto de pele em camundongos (MASLI et al., 2000). A tolerância também foi induzida em receptores tratados com o soro anti-linfocitário em combinação com rapamicina e que receberam infusão das células da medula óssea do doador após o transplante (UMEMURA et al., 2000a). A administração de 150 milhões de células da medula óssea do doador C57Bl/10, sete dias após o transplante de pele em recipientes congênicos B10A tratados com o soro anti-linfocitário, revelou níveis de 8 a 10% de células do doador no baço que persistiram ao longo do período de sobrevivência do enxerto (MONACO et al., 2001).

O bloqueio de moléculas co-estimuladoras do receptor, junto com a infusão de células alogênicas do doador, têm se mostrado uma estratégia eficaz na indução da tolerância ao enxerto. WEKERLE e cols. (2000) demonstraram que a administração de altas doses de células da medula óssea do doador, seguida de uma injeção com o anticorpo monoclonal anti-CD154 (CD40L) e da proteína de fusão CTLA4-Ig, resultou em microquimerismo. Este foi instalado por longo tempo juntamente com a incorporação da pele alogênica enxertada. Uma dose única de células esplênicas do doador BALB/c induziu tolerância ao enxerto de pele quando foi infundida em combinação com o anticorpo monoclonal anti-CD40L nos receptores C57Bl/6, sete dias antes do transplante (MARKEES et al., 1997). Outros autores demonstraram a necessidade de várias injeções de células da medula óssea do doador concomitante à administração do anti-CD40L para promover um estado de quimerismo durável e a tolerância ao enxerto de pele totalmente alogênica (DURHAM et al., 2000). LU e cols. (1999) em modelo murino, provaram que receptores C3H, infundidos com células dendríticas imaturas do doador alogênico concomitante à administração do anticorpo monoclonal anti-CD40L, aceitaram o coração de animais B10 transplantados 7 dias após o tratamento.

O prolongamento da sobrevivência do enxerto renal foi observada em ratos que receberam a infusão de células mononucleares do sangue periférico do doador, 40 dias antes do transplante, tendo sido submetidos a um período de 10 dias de tratamento com ciclosporina (NORIS et al., 1999). Esses animais apresentaram um microquimerismo persistente por 70 dias após o transplante. A depleção de células MHC classe II⁺ da suspensão de células mononucleares do sangue periférico do doador, administradas previamente ao transplante, resultou na diminuição considerável do tempo de sobrevivência do enxerto renal em ratos tratados com ciclo curto de ciclosporina (NORIS et al., 2001).

Na ausência de imunossupressão, vários modelos têm indicado a viabilidade da administração das células do doador na indução de tolerância ao enxerto. YANG e cols. (1998), utilizando camundongo transgênico com TCR específico para a região L^d da molécula de classe I, mostraram que uma única infusão de linfócitos provenientes de doadores L^{d+}, dezoito dias antes do transplante, foi capaz de prolongar a sobrevivência do enxerto de pele. Camundongos DBA/2 aceitaram a pele enxertada 4 dias após a infusão de 3×10^7 células linfóides provenientes do doador F₁ semi-alógeno. Nesses recipientes, a presença das células do doador estava correlacionada à redução da resposta de células T específicas aos antígenos semi-alógenos (SHENG-TANNER et al., 1992). MORITA e cols. (1998) mostraram que a injeção de 30 milhões de células esplênicas pela veia porta, seguida da infusão endovenosa da mesma quantidade de células da medula óssea, cinco dias após, induziu tolerância ao enxerto de pele em modelo de doador e receptor com MHC totalmente incompatível. O estudo revelou um pequeno número de células do doador no baço e na medula óssea dos receptores; por outro lado, os animais que rejeitaram a pele não apresentaram células do doador. Em ratos, a administração de 6×10^7 leucócitos provenientes do baço dos doadores,

imediatamente após o transplante renal, induziu tolerância ao enxerto alogênico por deleção das células alo-reativas na periferia (YAN et al., 2001).

A tolerância aos antígenos menores de histocompatibilidade foi demonstrada em camundongos tratados com o anticorpo não lítico anti-CD4, três dias antes da administração de células da medula óssea (BEMELMAN et al., 1998); ficou evidenciado que altas doses do inóculo induziam não resposta ao enxerto, por deleção das células reativas, enquanto que a tolerância induzida por doses baixas estava associada à supressão ativa.

1.2. O envolvimento do timo na tolerância aos aloantígenos

A importância do timo no processo de aquisição de tolerância aos antígenos estranhos em adultos foi mostrada por ELLISON e WAKSMAN (1970); em seus estudos, a injeção intra-tímica de um antígeno solúvel em ratos adultos induziu um estado de não resposta sistêmica a esse imunógeno. POSSELT et al. (1990) reproduziram esse fenômeno após a injeção de células alogênicas dentro do timo. Esta abordagem permitiu uma série de estudos demonstrando o efeito da injeção intra-tímica das células do doador na tolerância aos alo-enxertos cardíaco, hepático, de cólon e de pele (revisado por REMUZZI et al., 1995).

A natureza do aloantígeno que está sendo reconhecida no timo foi demonstrada através de experimentos nos quais moléculas solúveis do MHC, obtidas a partir de células mononucleares, foram inoculadas no timo. Essa estratégia foi suficiente para induzir tolerância ao alo-enxerto cardíaco (OLUWOLE et al., 1993) e às ilhotas pancreáticas (QIAN et al., 1993). A inoculação intra-tímica de alo-peptídeos sintéticos do MHC sugeriu uma relação inversa entre a imunogenicidade dessa molécula e a tolerância por ela induzida (SAYEGH et al., 1994).

A aquisição da tolerância intra-tímica pode envolver a deleção ou inativação clonal dos precursores das células T reativas em diferenciação no timo ou ainda, a geração de células T regulatórias (ITOH et al., 1999). ODORICO e cols. (1993) demonstraram que a ausência de resposta imune aos antígenos do alo-enxerto cardíaco era mediada principalmente por deleção ou inativação dos precursores das células T aloreativas no timo, proporcionado pela injeção intra-tímica de células da medula óssea do doador. As observações se baseiam no fato de que a infusão de células em somente um lobo do timo não foi suficiente para promover a sobrevivência do enxerto, indicando que a porção do órgão que não teve contato com os aloantígenos permitiu a maturação normal dos linfócitos T.

Uma outra questão pertinente a esse fenômeno é em relação à manutenção da tolerância periférica. AGUS e cols. (1991) verificaram que células T ativadas são capazes de migrar para o timo e permanecer na medula por períodos prolongados. Outros autores observaram deleção clonal intra-tímica, assim como morte de células T maduras alo-reativas que entraram no timo após o transplante alogênico (CHAU et al., 2002). As observações sugerem que um dos mecanismos pelos quais a ausência de resposta aos aloantígenos se mantém na periferia é pela deleção das células alo-reativas no timo que para lá migraram após ativação pelo enxerto. A presença do aloantígeno na periferia sugere o envolvimento de populações de células T com propriedades regulatórias na manutenção da tolerância. Esse fato baseia-se principalmente nas observações de ODORICO e cols. (1993). Em seus experimentos, a transferência adotiva de células esplênicas provenientes de ratos não transplantados e tolerantes aos aloantígenos, após a injeção no timo, permitiu a aceitação do transplante cardíaco do doador em receptores secundários.

1.4. O enxerto

As diferenças na suscetibilidade à rejeição dos alo–enxertos de diferentes naturezas segue uma hierarquia bem estabelecida. Dentre os órgãos ou tecidos mais suscetíveis a esse processo estão a pele, o cólon e os pulmões, seguidos pelas ilhotas pancreáticas, o pâncreas, o coração e o fígado os quais são mais susceptíveis à aceitação, respectivamente (JONES et al., 2001). Embora aceitos, os mecanismos que regem esta seqüência de suscetibilidade ainda não são claros.

Em relação ao transplante de pele, existem alguns fatores bem estabelecidos que, em conjunto, servem como explicações potencialmente relevantes para o fenômeno da rejeição. Estes se referem à vascularização e ao tamanho do enxerto, aos antígenos presentes, e à sua função imunológica intrínseca natural.

Enxertos que não são vascularizados podem sofrer degeneração isquêmica que levam à inflamação e à necrose. Este processo pode aumentar a imunogenicidade do tecido e torná-lo mais suscetível à destruição. Esta característica, por si só, poderia ser responsável por grande parte do fenômeno, uma vez que o enxerto de pele, além de não vascularizado, é de tamanho pequeno. Isto implicaria em um número menor de células passíveis de destruição para a rejeição. SUN et al. (1996) mostraram que múltiplos enxertos resultaram num prolongamento do tempo de sobrevivência dos mesmos em relação a um único, o qual sofreu rejeição aguda. Em relação à questão da vascularização, algumas observações demonstraram que alo–enxertos de pele que foram vascularizadas eram tão vulneráveis à rejeição quanto o enxerto normal (CHO et al., 1972). Por outro lado, enxertos cardíacos não vascularizados de doador alogênico apresentaram aumento do tempo de sobrevivência em relação à pele enxertada nas mesmas combinações de linhagens doador–receptor (DAVIS et al., 1980). Estas

observações sugerem que a vascularização não contribui significativamente para o aumento da vulnerabilidade deste tecido à rejeição.

A existência de antígenos que são expressos exclusivamente na pele foi demonstrada em estudos utilizando-se quimeras hematopoiéticas. Nestes recipientes, a pele do doador foi rejeitada, muito embora a célula hematopoiética do mesmo tenha permanecido indefinidamente, não apresentando reatividade aos aloantígenos *in vitro* (FUCHIMOTO et al., 2001). A ausência de rejeição ao transplante cardíaco nestas quimeras, mesmo naqueles que rejeitaram a pele, sustentam o conceito que a pele expressa antígenos imunogênicos que não são expressos ou não são imunogênicos no coração ou no tecido hematopoiético.

Um outro fator que torna a pele suscetível à rejeição é a própria natureza imunogênica deste órgão. A pele apresenta numerosas células de Langerhans – dendríticas da epiderme – que apresentam antígenos que atravessaram a barreira epidérmica. Experimentos *in vitro* com suspensões isoladas de células de Langerhans mostraram que estas células são estimuladoras fracas de células T naïve, mas na presença de fatores de crescimento com GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos), adquiriram fenótipo de células maduras e alcançaram propriedades imunoestimulatórias potentes (SCHULER et al., 1985; WITMER-PACK et al., 1987).

Outras evidências sobre o comportamento das células dendríticas de tecidos não linfóides, nas etapas iniciais da resposta imune, em camundongos, vêm de LARSEN e cols. (1990). No transplante singênico, estes autores demonstraram que estas células migraram da epiderme para a derme e depois para fora do enxerto. O trajeto das células foi acompanhado por mudanças no seu tamanho e na expressão de moléculas Ia, que aumentaram sua propriedade estimulatória. As investigações

sugerem que essas células devem ter um comportamento migratório muito semelhante *in vivo* em direção às áreas T dependentes.

Tendo em vista essas observações torna-se fácil deduzir que, no caso dos enxertos alogênicos, a migração das células de Langerhans para os linfonodos do recipiente poderia proporcionar um estímulo significativo para o início do processo de rejeição.

Recentemente, JONES e cols. (2001) demonstraram que a suscetibilidade diferencial da rejeição dos enxertos de pele, das ilhotas pancreáticas e do coração não estavam relacionados ao número de células T CD8⁺ alo-reativas geradas. Esses autores sugerem que a vulnerabilidade à rejeição que a pele e as ilhotas pancreáticas apresentam, se deve, principalmente, ao tamanho do enxerto e ao micro-ambiente do mesmo.

1.5. Alguns dos mecanismos envolvidos na rejeição/tolerância do aloenxerto

Uma das formas pelas quais é possível compreender os mecanismos envolvidos na rejeição do alo-enxerto e identificar as células que participam deste processo faz-se pelo bloqueio ou depleção de determinados tipos celulares, ou ainda pela prevenção da cooperação da célula T através das suas moléculas acessórias.

É bem estabelecido que a ativação celular envolva a sinalização para o TCR, via o complexo MHC-peptídeo pela célula apresentadora de antígenos (APC), e seja também conseqüente da interação das moléculas CD28 – receptores constitutivos presentes nas células T primárias – com os ligantes B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) presentes nas células apresentadoras de antígeno (APCs). A interação entre as moléculas CD40, expressas nas APCs, e o CD40L, também é aceita como participativa no processo de ativação das células T e na cooperação entre linfócitos T e B

(GREWAL & FLAVEL, 1998). Diferentemente do CD28, o CD40L é expresso predominantemente nas células T CD4⁺ ativadas e em algumas células T CD8⁺ (ZHAI et al., 2002). Vários estudos têm mostrado que a utilização de anticorpos ou proteínas de fusão que bloqueiam a interação B7/CD28 e CD40/CD40L, com ou sem a administração das células do doador, têm sido eficientes no aumento do tempo de sobrevivência do alo-enxerto (LARSEN et al., 1996; SAYEGH et al., 1997; MARKEES et al., 1998; JUDGE et al., 1999).

Os estudos que evidenciaram a incorporação do enxerto alogênico após a administração do anticorpo monoclonal anti-CD40L (MARKEES et al., 1997; LU et al., 1999; DURHAM et al., 2000; ZHAI et al., 2002), ou desse com a proteína de fusão CTLA4-Ig (WEKERLE et al., 2000; SHIRASUGI et al., 2002), concomitante à infusão das células do doador, referiram-se à interferência na cooperação celular através do bloqueio destas moléculas, sugerindo o envolvimento das mesmas na rejeição. LARSEN et al. (1996) mostraram a eficiência do bloqueio simultâneo das moléculas CD28 e CD40L no prolongamento da sobrevivência dos aloenxertos de pele e de coração em camundongos.

Apesar das inúmeras evidências, os mecanismos envolvidos na tolerância através do bloqueio da via de sinalização do CD28 e CD40L, assim como a magnitude da participação do CD28, ainda não são claros. Os estudos de MAIER et al. (2001) mostraram que camundongos deficientes na molécula CD28 não foram capazes de aceitar o enxerto cardíaco de doador totalmente alogênico, porém o fizeram quando o doador portava MHC semi-compatível. Esses autores observaram a participação das células NK do recipiente, as quais eram “silenciadas” pela interação da porção compatível do MHC do doador com os receptores de inibição da atividade das mesmas, presentes nestas células. Por outro lado, somente o bloqueio do CD28 não foi

suficiente para prevenir a rejeição do alo-enxerto em ratos (LARSEN et al., 1996; HALE et al., 1997). Portanto, as evidências apontam para um envolvimento menos importante para o CD28 na rejeição de enxertos mas que poderia "dimensionar" a sua atividade efetora quando em conjunto com outras moléculas.

A participação da via de co-estimulação CD40-CD40L na rejeição aguda de enxertos têm sido evidenciada através dos modelos de indução de tolerância que empregam o anti-CD40L em camundongos, como já citado. No entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento do CD40L no mecanismo da rejeição de enxertos em recipientes sensibilizados. ZHAI e cols. (2002) provaram que as células T CD8⁺ alo-reativas de camundongos, sensibilizados com o alo-enxerto de pele, mantiveram a sua função citotóxica independente do bloqueio da molécula CD40L. Essas observações apontam para o requerimento diferencial da sinalização desta molécula para células T CD8⁺ *naïve* e de memória. A depleção de células T CD8⁺ juntamente com a administração do anticorpo anti-CD40L, em recipientes sensibilizados, levou ao aumento do tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco nesses animais, aspecto de relevância clínica.

Conforme já mencionado, apesar das evidências, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na tolerância induzida pelo bloqueio das moléculas co-estimuladoras, assim como a durabilidade das mesmas. WILLIAMS et al. (2000) mostraram que a composição genética de diferentes linhagens de camundongos estava relacionada com a habilidade de se gerar células T CD8⁺ alo-reativas por vias independentes das interações que envolvem as vias de co-estimulação pelas moléculas CD28/ B7 e CD40/CD40L.

A magnitude do envolvimento das células T CD4⁺ na rejeição do alo-enxerto foi verificada através da administração do anticorpo monoclonal anti-CD4 que bloqueia mas não depleta a molécula YTS177 (SAITOVITCH et al., 1996; LEHMANN et al.,

1997). Nesses modelos, ambos os tratamentos resultaram na tolerância ao enxerto. Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno, embora ainda não bem elucidados, parecem incluir os de tolerância ativa. SIEGLING et al. (1994) observaram a supressão da resposta das células Th1 em ratos tratados com o anticorpo desta natureza. Os estudos de STUMBLES & MASON (1995) evidenciaram a indução do fenótipo Th2 após a ativação das células T CD4⁺ na presença do mesmo anticorpo. LEHMANN e cols. (1997) documentaram, em ratos tratados com o anti-CD4 e tolerantes ao enxerto renal, a inibição da produção das citocinas do padrão Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) no enxerto, bem como o decréscimo da relação IFN- γ /IL-4 quando comparados aos controles não tratados.

Em um outro modelo, a administração do anticorpo YTS177 anti-CD4 foi concomitante à infusão das células do baço do doador, realizadas 28 dias antes do transplante (SAITOVITCH et al., 1996), e que este período foi necessário para a indução efetiva de um estado de não resposta aos aloantígenos, e que o pré-tratamento leva à geração da população de células T CD4⁺ regulatórias. SCULLY e cols. (1994) mostraram que os linfócitos do recipiente que foi tratado com o anti-CD4, requerem 5 semanas de co-existência com os antígenos do doador para adquirir a habilidade de transferir tolerância para receptores singênicos normais. Recentemente, KINGSLEY e cols. (2002) comprovaram a geração da população de células TCD4⁺CD25⁺ regulatórias no modelo de indução de tolerância ao alo-enxerto de pele, através da administração do anti-CD4 YTS177 em conjunto com as células do doador. Os estudos evidenciaram que os mecanismos pelos quais esta população exerce seu efeito regulatório envolvem a participação da molécula CTLA4 e a secreção da IL-10.

Muito embora a depleção das células T CD4⁺, através da administração de anticorpos, tenham induzido um estado de tolerância permanente ao alo-enxerto

(HERBERT et al., 1988), a eliminação desta população celular pode ser crítica após o transplante, comprometendo o processo de aceitação (SABLINSKI et al., 1991). Esses e outros estudos (SABLINSKI e cols., 1992) demonstraram que a depleção desta população no momento em que o recipiente entrou em contato com o aloantígeno induziu a prolongamento do tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco.

Em conjunto, essas observações sugerem que as células T CD4⁺ alo-reativas têm uma participação importante no processo de rejeição dos alo-enxertos. Por outro lado, a aquisição da tolerância aos antígenos alogênicos parece também envolver a inibição funcional das atividades efectoras dessa população.

Outra população celular que merece atenção no processo da rejeição do alo-enxerto é a das células NK; as observações de que essas podem reconhecer e matar células linfóides infundidas que não “carregam” as moléculas de MHC de classe I presentes nas mesmas, dão apoio à hipótese do *missing self* (LJUNGGREN & KARRE, 1991). Os estudos de CORREA & RAULET (1995) demonstraram uma inibição dose-dependente da atividade das células NK regida pelo complexos peptídicos de classe I. Estas observações indicam função primária para as NK na destruição das células que diminuíram a expressão das moléculas de MHC de classe I, ou as eliminaram da superfície. SHENG-TANNER et al. (1992) evidenciaram que a remoção das células totalmente alogênicas foi mais eficiente que a das semi-alogênicas, após a infusão das mesmas, e atribuíram este fenômeno às células NK do receptor. Essas observações baseiam-se em experimentos nos quais o aumento da atividade das células NK pelo tratamento do recipiente com inosina:citidina polimerizada (poli I:C) levou à diminuição dos níveis do microquimerismo. O papel imunoregulatório desta população foi ainda recentemente demonstrado em camundongos tratados com as células esplênicas do doador e com soro anti-timocitário. Nesse modelo, o prolongamento da sobrevivência

da pele fez-se dependente da presença das células NK do doador semi-alogênico. Este fato não foi evidenciado quando as NK eram provenientes de doador com função alterada nesse compartimento, apesar de apresentar H-2 semi-compatível (GOLDSTEIN et al., 2001).

O envolvimento das células NK na rejeição ao transplante alogênico foi recentemente mostrado em modelo de transplante cardíaco em camundongos deficientes da molécula CD28 (MAIER et al., 2001). Nesse estudo, a depleção da população de células NK 1.1 dos recipientes permitiu a prolongação do enxerto cardíaco de doador totalmente alogênico. Nenhuma intervenção foi necessária quando o enxerto era proveniente de camundongos F₁ semi-alogênicos, sugerindo que a porção semi-compatível das moléculas do H-2 do enxerto se ligaram aos receptores inibitórios das células NK, silenciando a sua atividade citotóxica e, portanto, contribuindo para o prolongamento da sobrevivência do mesmo.

KONDO et al. (2000) correlacionaram o aumento da expressão do RNA mensageiro para determinadas quimiocinas, com a presença das células NK infiltrantes no início da rejeição aguda do alo-enxerto. Essas observações, somadas às demais, atribuem à essas células uma função relevante na rejeição de transplantes alogênicos.

1.6. O paradigma Th1/Th2 na rejeição de alo-enxertos ou tolerância aos mesmos

As citocinas produzidas pelas sub-populações T CD4+ [Th1 e Th2] apresentam diferentes funções na rede complexa que caracteriza a resposta imune. As citocinas secretadas pelas células Th1, como o IFN- γ e a IL-2, estão relacionadas aos processos efetores de ativação ou proliferação celular, enquanto as citocinas tipo Th2, dentre as quais as IL-4, IL-5 e IL-10, parecem antagonizar os efeitos das células Th1 *in vivo* (ABBAS et al., 1996).

No transplante, as citocinas derivadas das células Th1 podem promover a rejeição pela geração de linfócitos T citotóxicos, de anticorpos que fixam complemento, e ativação de macrófagos (DUQUESNOY & DEMETRIS, 1995). Os níveis de transcrição dessas citocinas têm sido correlacionadas a episódios de rejeição aguda severa. STINN et al. (1998) observaram, em modelo de transplante cardíaco murino, um aumento no infiltrado de células Th1 e de linfócitos citotóxicos (Tc)1 no enxerto, com qualquer detecção de IL-4. Além do mais, no momento da falência do órgão, as células T CD8⁺ representavam a fonte predominante de IFN- γ . Essa ausência de IL-4 e a produção de IFN- γ também foi associada à rejeição de enxerto renal em ratos (SAGGI et al., 1999). Em humanos, o aumento da expressão de IL-2 no enxerto, associado à rejeição aguda, também tem sido relatado (DALLMAN et al., 1991; DALLMAN, 1993; NICKERSON et al., 1997). A relação causa-efeito entre a produção da IL-2 e a rejeição foi deduzida por estudos que utilizaram anticorpos que bloquearam os receptores dessa citocina (KUPIEC-WEGLINSKI et al., 1986; VINCENTI et al., 1998). Apesar do mecanismo de ação desse anticorpo não ser claro, os estudos sugerem que IL-2 tenha uma participação importante na rejeição.

Citocinas produzidas pelas células Th2, por outro lado, comprovaram-se moduladoras da rejeição aguda e envolvidas no desenvolvimento da tolerância ao alo-enxerto (TAKEUCHI et al., 1992; SAYEGH et al., 1995). SAGGI e cols. (1999) mostraram um aumento da expressão da IL-10 e uma expressão substancial de IL-4 no transplante renal de ratos tratados com ciclosporina e rapamicina, tolerantes ao enxerto; a IL-4 não foi detectada em ratos com histologia representativa de rejeição aguda. Não houve ainda, qualquer evidência da expressão do gene do IFN- γ nos ratos tratados, e apresentando histologia normal do enxerto.

Apesar dos estudos que associam os padrões de produção das citocinas Th1 e Th2 com a rejeição e a tolerância, respectivamente, esses padrões nem sempre parecem ser excludentes. Na rejeição aguda, estudos com camundongos deficientes na produção da IL-2 ($IL-2^{-/-}$) demonstraram que esses animais foram eficientes em rejeitar o alo-enxerto como ilhotas pancreáticas (STEIGER et al., 1995), ou coração vascularizado (DAI et al., 1998). Assim como a ausência da IL-2 não mantém a integridade do enxerto, camundongos $IFN-\gamma^{-/-}$ também foram capazes de rejeitar o alo-enxerto cardíaco mais rapidamente quando comparados aos selvagens (SALEEM et al., 1996). Outros estudos provaram que o tempo de rejeição aguda das ilhotas pancreáticas não foi retardada nesses recipientes (revisado em LAKKIS, 1998). A utilização de anticorpos neutralizantes da atividade do $IFN-\gamma$, em estudo com transplante de pele em macaco Rhesus – *Macaca mulatta* –, mostrou que esse procedimento não foi capaz de evitar a rejeição do órgão (STEVENS et al., 1990). Juntos, esses estudos apontam para a função imunoreguladora de IL-2 e $IFN-\gamma$ *in vivo*.

O trabalho de KONIECZNY et al. (1998) mostrou que o bloqueio das vias de sinalização do CD28 e do CD40L em camundongos $IFN-\gamma^{-/-}$ ou em animais tratados com anticorpos neutralizantes da atividade do $IFN-\gamma$, no momento do transplante, não foram eficientes em induzir tolerância ao coração totalmente alogênico. Diferentemente do observado, na presença dessa citocina a tolerância ao órgão foi induzida. Da mesma forma, a ausência da IL-2 impossibilitou a sobrevivência prolongada do coração enxertado após o bloqueio das moléculas co-estimuladoras, ao contrário do demonstrado em animais $IL2^{+/+}$.

Em relação ao padrão de produção de citocinas das células Th2, principalmente IL-4, estudos têm mostrado aspectos como por exemplo, o aumento da expressão dessa citocina nas ilhotas pancreáticas alogênicas ou no tecido cardíaco, e

a rejeição dos mesmos (revisado em LAKKIS, 1998). Outros trabalhos apontam para o aumento do tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco, induzido por regime de bloqueio da co-estimulação das células T, em camundongos IL-4^{-/-}, apesar da preponderância de citocinas do tipo Th1 (NICKERSON et al., 1996; LAKKIS et al., 1997). A administração da IL-10 em camundongos não necessariamente preveniu a rejeição aguda e, em alguns casos, induziu a perda acelerada do enxerto por ativação de linfócitos T citotóxicos (ZHENG et al., 1995).

Os estudos de KRIEGER et al. (1996) mostraram que ratos tolerantes, tratados previamente com dose única do anticorpo monoclonal anti-CD2, apresentaram um aumento significativo da expressão da IL-2, IL-4 e do IFN- γ no enxerto, 100 dias após o transplante. SAGGI et al. (1999) observaram produtos de PCR para a IL-10 no enxerto renal de ratos tratados com ciclosporina e rapamicina com histologia representativa de rejeição aguda.

Os estudos anteriormente mencionados mostraram que não seria coerente questionar o paradigma Th1/Th2, no transplante, através de estudos que utilizam camundongos deficientes na produção das citocinas implicadas na rejeição ou tolerância, principalmente pelo fato de que as primeiras podem apresentar dualidade de funções. Conforme o modelo proposto por LAKKIS (1999), a IL-2 e o IFN- γ podem ser críticos na modulação da resposta alo-reativa limitando a proliferação de células ativadas ou promovendo a morte por ativação (apoptose) das mesmas. Um outro exemplo é a participação do CTLA4 na tolerância. Essa molécula é expressa após a ativação da célula T; a sua alta afinidade com o ligante na célula apresentadora de antígenos pode inibir a progressão do ciclo celular.

A associação da tolerância com a ausência ou baixa expressão da IL-2 e do IFN- γ não indica, necessariamente, que as mesmas não tiveram participação no processo.

Em conjunto, os estudos que utilizaram a administração de células do doador antes do transplante como estratégia de indução de tolerância ao alo-enxerto, principalmente as da medula óssea, mostraram que este fenômeno pode ser alcançado, mesmo em recipientes não imunossuprimidos. Além disso, os mecanismos envolvidos na aceitação do mesmo têm sido mostrados como, muitas vezes, conseqüentes da modulação do sistema imunológico pela presença das células do doador. Apesar da documentação sobre a ausência do vínculo entre o microquimerismo e a tolerância ao enxerto, muitos trabalhos sugerem a obrigatoriedade desta relação.

Resultados preliminares mostraram que administração de células do baço com as da medula óssea do doador (BALB/c x C57Bl/6) F_1 resultou no prolongamento do tempo de sobrevivência do enxerto de pele em receptores BALB/c, não imunossuprimidos, principalmente em relação grupo que recebeu somente as células semi-alogênicas do baço. No presente estudo, procurou-se investigar os mecanismos envolvidos no aumento de tempo sobrevivência do enxerto, o estabelecimento do microquimerismo e a sua relação com a sobrevivência do transplante, em modelos de transplante de pele e cardíaco.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Avaliar o tempo de sobrevivência dos enxertos de pele e cardíaco, em receptores BALB/c, após a administração de células do baço ou dessas combinadas às da medula óssea, todas provenientes do doador (BALB/c x C57Bl/6)F1;
- 2.2. Verificar o desenvolvimento do microquimerismo em camundongos transplantados ou não, após a inoculação das células do doador, e se essa condição é essencial para o aumento da sobrevida do aloenxerto na ausência de tratamento imunossupressor;
- 2.3. Avaliar o padrão de produção de citocinas nos grupos transplantados após a administração das diferentes populações de células;
- 2.4. Estudar a expansão de subpopulações celulares T CD4⁺, T CD8⁺ e B, após a administração das células do doador ou após o transplante;
- 2.5. Estudar o envolvimento das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40L na ativação das células semi-alogênicas e na rejeição diferencial entre os grupos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais de Experimentação

Camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas de idade das linhagens BALB/c (H-2^d) e camundongos da geração (BALB/c x C57BL/6)F1 (H-2^{b/d}), foram obtidos no Biotério de Criação da Universidade de São Paulo e mantidos no de Experimentação do Departamento de Imunologia ICB-USP, alojados em unidades microisoladoras. Camundongos BALB/c foram utilizados como receptores enquanto que (BALB/c x C57BL/6)F1 serviram como doadores. Os camundongos estavam livres de ectoparasita, endoparasitas, bactérias e vírus patogênicos. Os procedimentos realizados estavam de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA).

3.2. Abordagem Experimental

Para se avaliar a migração das células do doador (BALB/c x C57BL/6)F1 no organismo do receptor, grupos de camundongos BALB/c receberam uma infusão de 5 milhões de células do doador F1 pela via endovenosa (veia da cauda). Conforme o experimento, as células injetadas foram as da medula óssea ou estas misturadas com células do baço do doador (na proporção 2:3, respectivamente). As células foram previamente marcadas com o CFDA-SE (CFSE; Molecular Probes, Oregon, EUA) e identificadas por citometria de fluxo. Os camundongos do grupo controle receberam infusão do mesmo preparado de células semi-alogênicas porém não marcadas. Os camundongos receptores foram sacrificados em diferentes tempos após a infusão, e os órgãos como o baço, timo, medula óssea, fígado e os linfonodos axilares e inguinais foram preparados para análise. O microquimerismo também foi averiguado pela técnica

de PCR semi-quantitativo.

Camundongos BALB/c receberam enxertos de pele da cauda do doador (BALB/c x C57BI/6)F1 ou transplante cardíaco 21 dias após a infusão das células semi-alogênicas. O microquimerismo também foi avaliado em diferentes tempos após o transplante cardíaco.

Outros experimentos incluíram as análises da cinética da expressão dos receptores de superfície CD28 e CD40L, ou da avaliação de populações celulares CD4⁺, CD8⁺ e B220⁺ após a infusão das células semi-alogênicas.

3.3. Isolamento e preparação das células do doador

Células da medula óssea foram retiradas de cada fêmur dos camundongos (BALB/c x C57BI/6)F1 (n=2 ou 3) com jatos de meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) (Gibco BRL, Rockville, EUA) sem soro utilizando-se seringa de 1ml com agulha (13 x 3,8). As células foram avaliadas quanto à viabilidade através do teste de exclusão com azul de trypan (Gibco BRL, Rockville, EUA) e resuspendidas na concentração de 5×10^6 células/200 μ l em meio DMEM para a infusão nos receptores ou em 5×10^6 células/ml para marcação com o corante CFDA-SE (CFSE; Molecular Probes, Oregon, EUA), conforme as instruções do fabricante. Para isso, as células foram incubadas com o CFSE na concentração final de 5 μ g/ml durante 15 minutos em banho-maria à 37⁰C. A marcação foi bloqueada com soro fetal bovino (SFB; Hyclone, EUA) (10% do volume total). As células foram lavadas e resuspendidas em meio DMEM sem soro na concentração de 5×10^6 /200 μ l e injetadas nos Após este período, as células foram lavadas, resuspendidas em meio DMEM sem soro e marcadas com CFSE conforme metodologia descrita acima. As células

marcadas foram inoculadas nos receptores BALB/c por via endovenosa na concentração de $5 \times 10^6/200 \mu\text{l}$.

3.4. Cultura Leucocitária Mista

O baço dos camundongos BALB/c e (BALB/c x C57BL/6)F1 foram retirados e individualmente macerados em meio DMEM. Após a lavagem (1000 rpm por 10 minutos), as hemácias do baço foram eliminadas com solução 0.83% tris-amônio clorídrico (tampão de lise) por 4 minutos à temperatura ambiente, sendo as células posteriormente lavadas com PBS. As células foram resuspendidas em DMEM suplementado com 0.1mM de aminoácidos não essenciais, 0.1mM de vitaminas, 2mM L-glutamina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 0.05mM 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, EUA) e 5% de SFB e avaliadas quanto a viabilidade com azul de trypan.

Para os ensaios de proliferação, $2,5 \times 10^5$ células dos baços dos camundongos receptores foram cultivadas com células semi-alogênicas ou ainda com células autólogas, todas irradiadas (3000 rad), na proporção 1:1 em 200 μl de meio de cultura completo enriquecido com 5% de SBF. As células foram cultivadas em triplicata em placas de 96 poços fundo "U" (Costar, Cambridge, MA, EUA) por 5 dias em incubadora a 37°C com 9% de CO₂ (meio não contém HEPES). No final do período de incubação, a ³H-timidina (0,5 $\mu\text{Ci/poço}$; Amersham International, Buckinghamshire, UK) foi adicionada, sendo incorporada por um período de 16 a 18 horas. As células foram recolhidas e a incorporação da ³H-timidina foi medida em contador β em contagens por minuto (CPM).

Para a avaliação da produção de citocinas no sobrenadante das co-culturas, 3×10^6 células do baço dos receptores foram cultivadas com células irradiadas (3000

rads) do baço dos camundongos F1 na proporção 1:1 (respondedor:estimulador) por 96 horas. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -20°C até o momento da dosagem.

O ensaio de resposta proliferativa foi padronizado partindo-se das proporções 1:1 e 1:2 (células estimuladoras:respondedoras) nos tempos totais de cultura de 3, 4 ou 5 dias. A melhor resposta frente ao estímulo semi-alogênico foi no tempo de 5 dias na proporção 1:1 (estimuladora:respondedora). A proliferação frente ao estímulo singênico manteve-se no valor basal em todos os tempos.

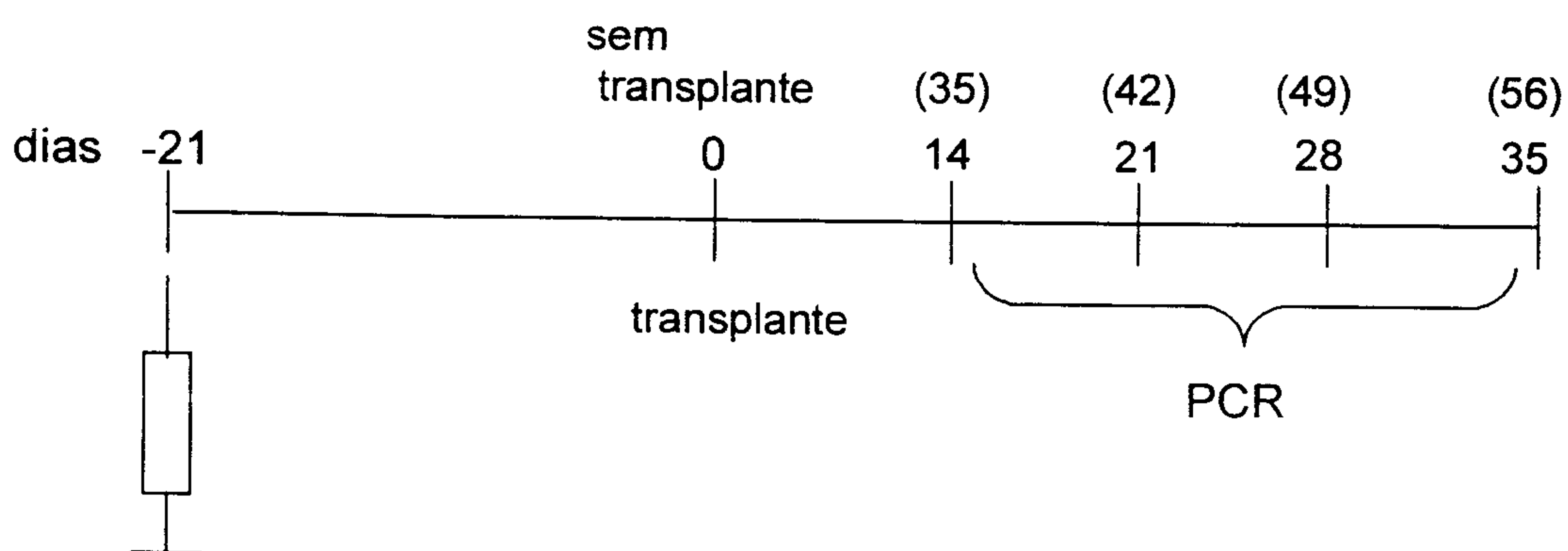
3.5. Citometria de Fluxo

Para a avaliação da expressão dos receptores de superfície nas células dos camundongos BALB/c ou dos doadores F1, as células do baço ou da medula óssea foram processadas, sendo as hemácias lisadas (no caso do baço), ressuspendidas em PBS contendo 3% de SFB e incubadas com o anticorpo anti-CD16/32 purificado (bloqueador do receptor Fc; Pharmingen, San Diego, CA, USA) durante 15 minutos a 4°C . As células foram então incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo direcionados às moléculas de superfície, ou com os respectivos isótipos controles, por 30 minutos à 4°C . Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anti-CD3-FITC (17A2), anti-CD4-FITC ou PE (RM4-5), anti-CD8a-FITC ou PE (53-6.7), anti-CD28-FITC (37.51), anti-CD154-PE (MR1), anti-CD45R/B220-PE (RA3-6B2), anti-CD49b/Pan-NK-FITC (DX5), anti-CD11b-FITC (M1/70), anti-CD11c-PE (HL3), todos provenientes da Pharmingen, San Diego, CA, USA. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS/SFB a 3% e fixadas com PBS/paraformaldeído 0,5%. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View, CA), equipado com 15mW laser de argônio e filtros para FITC (530 nm) e PE(585 nm), utilizando-se o software CellQuest

(Apple). A região estabelecida para o processamento das amostras, utilizando-se os parâmetros de dispersão da luz (FSC e SSC), excluiu as hemácias e as células não viáveis. O número de eventos adquiridos nos ensaios para avaliação da migração da células do doador foi 50.000 ou 100.000. Para outras análises, o número de eventos captados foram 10.000.

3.6. Análise do microquimerismo por PCR

O microquimerismo foi avaliado no baço, no timo, na medula óssea e nos linfonodos dos receptores BALB/c, transplantados ou não, após a infusão das células do doador (BALB/c x C57BI/6)F1. Para isso, camundongos BALB/c inoculados com as células dos camundongos F1 foram sacrificados no 14º após o transplante ou no 35º dia (não transplantados) após a injeção, tendo seus órgãos como os linfonodos (axilares e inguinais), o baço, a medula óssea e o timo retirados e o DNA extraído pela técnica fenol-clorofórmio.



Esquema da análise temporal das células H-2^b em camundongos transplantados ou não 21 dias após a inoculação das células do doador.

A β -actina foi utilizada como controle (forward: 5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'; reverse: 5' CTCCTTAATGTACGCACGATTC 3'). As condições de amplificação foram: 30 ciclos (94°C/1 min., 52°C/2 min., 72°C/3 min.).

O microquimerismo foi detectado pela presença do produto de amplificação da região entre os exons 5 e 6 do gene H-2^b: (senso: 5' AAACCTCCTCAGGCGCCGGCCCCGCC 3'; antisenso: 5' CCCGACCCCGAGTCAGGACCCCTCTT 3').

O DNA foi denaturado a 94°C por 2 minutos e as condições de amplificação foram: 28 ciclos (94°C/20 seg.; 59°C/30 seg.; 72°C/45 seg.).

As amplificações foram executadas em um volume de 20 μ l, com 10 mM Tris cloreto (pH8.3), 2 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP, 1U/ μ l de Taq polymerase e 0.1 μ M oligonucleotídeos.

Os produtos das reações de PCR foram corridos em um gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo. As quantificações foram realizadas por análise de densitometria utilizando-se o Alpha Scan Imaging Densitometer (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) e normalizados em relação aos sinais gerados pelas bandas de actina. Os dados foram plotados em histograma de forma semi-quantitativa considerando-se o valor 1,0 como o máximo de produto amplificado.

3.7. Análise das citocinas

As citocinas foram avaliadas no sobrenadante das co-culturas através da técnica de ELISA "sanduíche", utilizando-se os "kits" comerciais da Endogen (MA, EUA) ou da R&D Systems (MN, EUA) para a dosagem da IL-2, IL-10 e IL-4. A IL-2 também foi avaliada, assim como o IFN- γ , pelo sistema de anticorpos monoclonais de rato anti-

citocinas de camundongos, preparados no próprio Laboratório a partir do cultivo dos respectivos hibridomas (gentilmente cedidos pela Dra. Ise Abrahamsohn) que foram purificados e biotinilados quando anticorpos de detecção.

Placas duras com propriedade de “alta ligação” (high binding) (Coming, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 μ l do primeiro anticorpo diluído em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) por 16 horas à 4°C (4 μ g/ml de anti-IL-2 (1A12) e 8 μ g/ml de anti-IFN- γ (XMG1.2)). Após esse período, os poços foram bloqueados por 2 horas com 150 μ l de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T)(Sigma Chemical Co., MO, EUA) e 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a cada poço foram adicionados 50 μ l das amostras ou do recombinante murino em diluições seriadas a partir de 25ng/ml, em meio DMEM suplementado. As placas foram incubadas por 3 a 4 horas a temperatura ambiente e após o período de incubação, seguiram-se 3 lavagens com PBS-T. Aos poços foram adicionados 50 μ l do anticorpo biotinilado anti-IL-2 (5H4 a 4 μ g/ml) ou anti-IFN- γ (AN18 a 8 μ g/ml) e incubados por um período de 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com PBS-T (3 vezes) e 80 μ l do conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase; Sigma Chemical Co., MO, EUA), na diluição 1:4000 com PBS, foram adicionados e incubados por 1 hora. Após esse período, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e aos poços foram adicionados 100 μ l da solução substrato : 3% de H₂O₂, o cromógeno 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma Chemical Co.) a 0,5 mg/ml dissolvidos em tampão citrato/fosfato (citrato 0,028M e fosfato de sódio 0,044M, pH 5,2). A reação foi interrompida, após aproximadamente 30 minutos, com uma solução 0,2M de ácido cítrico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda entre 410 e 490 nm.

3.8. Transplante de Pele

O transplante de pele foi realizado segundo a técnica descrita em (Markees et al, 1990), porém por nós modificada. Basicamente, a pele da cauda do doador foi removida, cortada em quadrados de 1cm² sendo os cantos abaulados com auxílio de bisturi. A pele preparada foi mantida em PBS à temperatura ambiente até a hora do uso (máximo 2 horas). Após anestesiados, os camundongos BALB/c tiveram seu dorso depilado e lavado com etanol 70%. Uma cama para o enxerto foi preparada removendo-se uma área da derme e epiderme até o nível do músculo intrínseco, no tamanho do enxerto. Os enxertos foram colocados na cama, suturados com fio de nylon 6.0 com agulha triangular e cobertos com *band-aid*. A sobrevivência do enxerto foi monitorada 5 vezes por semana por exame visual e tátil. A rejeição foi definida a partir do dia em que 90% de toda a superfície da epiderme estava necrosada.

3.9. Transplante Cardíaco

O transplante cardíaco foi realizado, heterotopicamente, no abdômen do receptor através do método adaptado da técnica descrita em CORRY et al (1973). A cirurgia foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico com zoom até 32 vezes. A cavidade torácica do doador foi aberta e 1 ml da solução de heparina (5000U) foi injetada na veia cava inferior. As veias cava inferior e superior foram ligadas e as artérias aorta e pulmonar, seccionadas, sendo estas últimas ligadas em bloco. O coração foi removido e colocado em solução salina a 4°C enquanto o receptor foi preparado. A parede abdominal do receptor foi aberta e a artéria aorta e a veia cava inferior foram expostas e clampeadas. A aorta abdominal e a veia cava infrarenal sofreram uma incisão, e anastomoses término-laterais foram realizadas com as artérias aorta e pulmonar do doador. O fluxo sanguíneo foi restabelecido após a remoção dos

clamps e a contração cardíaca reiniciada no coração transplantado. Após o procedimento cirúrgico, o aloenxerto foi apalpado diariamente através da parede abdominal e avaliado subjetivamente em graus variando entre +4 (excelente batimento) a 0 (cessação dos batimentos), de acordo com a intensidade do impulso cardíaco.

4.0. Análise Estatística

Foram empregados testes estatísticos não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (teste posterior de Dunns); ou o paramétrico ANOVA (teste posterior de Tukey ou Dunnett), quando os dados se aproximaram à uma distribuição Gaussiana. Os dados relativos à sobrevivência do enxerto foram apresentados como média \pm o desvio padrão do tempo de vida ou como percentual do tempo de sobrevida. Os demais resultados também foram apresentados como média \pm o desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do tempo de sobrevivência do enxerto após a administração de células do baço com as da medula óssea do doador (BALB/c x C56BI/6)F₁ vinte e um dias antes do transplante.

4.1.1. Efeito no transplante de pele.

Resultados preliminares mostraram que a administração de 5×10^6 células, provenientes da medula óssea do doador (BALB/c x C57BI/6)F₁, vinte e um dias antes do transplante, foi capaz de prolongar o tempo de sobrevivência da pele enxertada em camundongos BALB/c (Figura 1). Os estudos de MORITA et al. (1998) demonstraram que a administração de células alogênicas do baço seguidas da inoculação das células da medula óssea do mesmo doador, facilitou a indução da tolerância pela anergia dos linfócitos T citotóxicos aloreativos, em receptores não imunossuprimidos. Outros dados (MENGEL, J. O.; comunicação pessoal) sugerem que a infusão de 5×10^6 células do baço induz rejeição acelerada do enxerto, nesse mesmo modelo. No presente trabalho, procurou-se, então, verificar a resposta ao enxerto quando uma composição de células da medula óssea junto com as do baço do doador (BALB/c x C57BI/6)F₁ fosse infundida antes do transplante. Para isto, camundongos BALB/c receberam uma infusão endovenosa de 5 milhões de células da medula óssea ou do baço ou ainda essas combinadas às da medula óssea na proporção 3:2, respectivamente. O transplante de pele foi realizado 21 dias após a administração das mesmas. O grupo controle recebeu somente o enxerto.

Os resultados mostraram que no sétimo dia, 100% dos animais inoculados com células de baço (n=5) já haviam rejeitado o enxerto. Em relação ao grupo que recebeu a composição de células do baço junto com as da medula óssea (n=5), 80% dos animais ainda apresentavam a pele enxertada íntegra, sendo que a rejeição do grupo

foi observada entre os dias 13 e 17. Quanto aos animais previamente tratados com as células da medula óssea somente, a rejeição ocorreu entre o 13º e 19º dia. No grupo que não recebeu células, a rejeição foi observada, no dia 9, em 100% dos indivíduos.

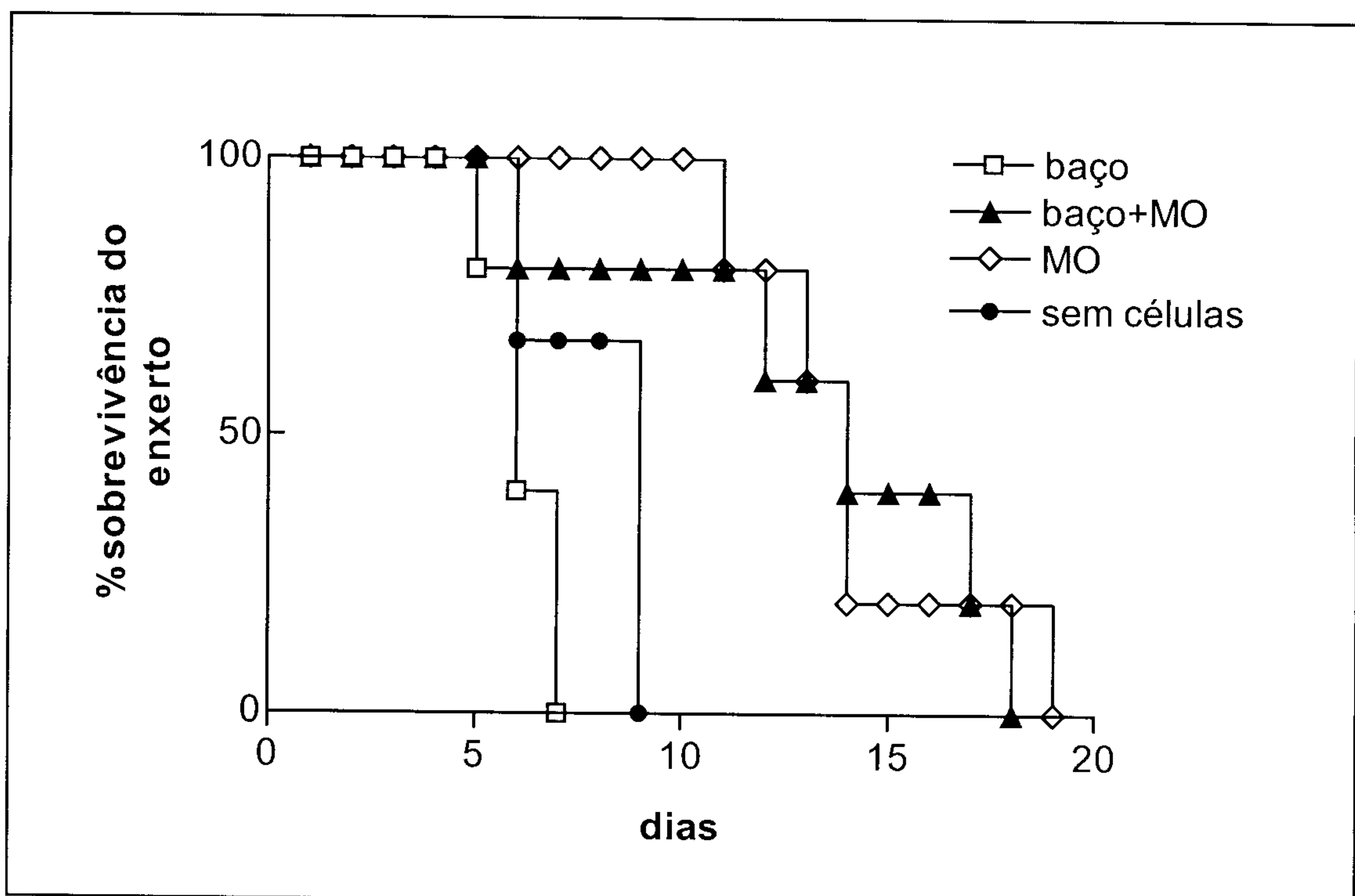


Figura 1. A inoculação de células H-2^{b/d} do baço junto com as da medula óssea 21 dias antes do transplante aumenta o tempo de sobrevivência do enxerto de pele semi-alógena em relação ao grupo inoculado somente com as células do baço. Camundongos BALB/c receberam injeção e.v. de 5×10^6 células semi-alógenas do baço ou da medula óssea junto com as de baço (proporção 2:3) 21 dias antes do transplante de pele de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F₁. Cada símbolo representa o tempo de sobrevivência do enxerto na população dos camundongos receptores.

4.1.2. Efeito no transplante cardíaco.

Com a finalidade de se verificar a influência da administração prévia de células semi-alogênicas no tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco, camundongos BALB/c (n=15) receberam uma injeção de 5 milhões de células da medula óssea ou dessas junto com as de baço do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁ na proporção 2:3, ou ainda, somente células do baço (n=5). Vinte e um dias após a injeção, os receptores foram transplantados com o coração do doador semi-alogênico.

Os resultados mostraram (Figura 2) que a injeção prévia das células da medula óssea com as de baço foi capaz de induzir um aumento do tempo de sobrevivência do enxerto em até 47 dias em 6,66% do grupo, sendo que 33,3% da população começou a rejeitar somente a partir do 21º dia. Os camundongos que receberam as células do baço do doador semi-alogênico rejeitaram o órgão rapidamente, sendo que no 10º dia a rejeição ocorreu em 100% dos animais, assim como observado no grupo controle. No grupo que recebeu somente células da medula óssea, a rejeição foi observada no período entre o 14º e o 20º dia.

Os experimentos em ambos os modelos de transplante mostraram que a mistura de células da medula óssea com as de baço possibilitou o prolongamento do tempo de sobrevivência do enxerto nos receptores destas células em relação ao controle e principalmente, em relação ao grupo inoculado com células de baço.

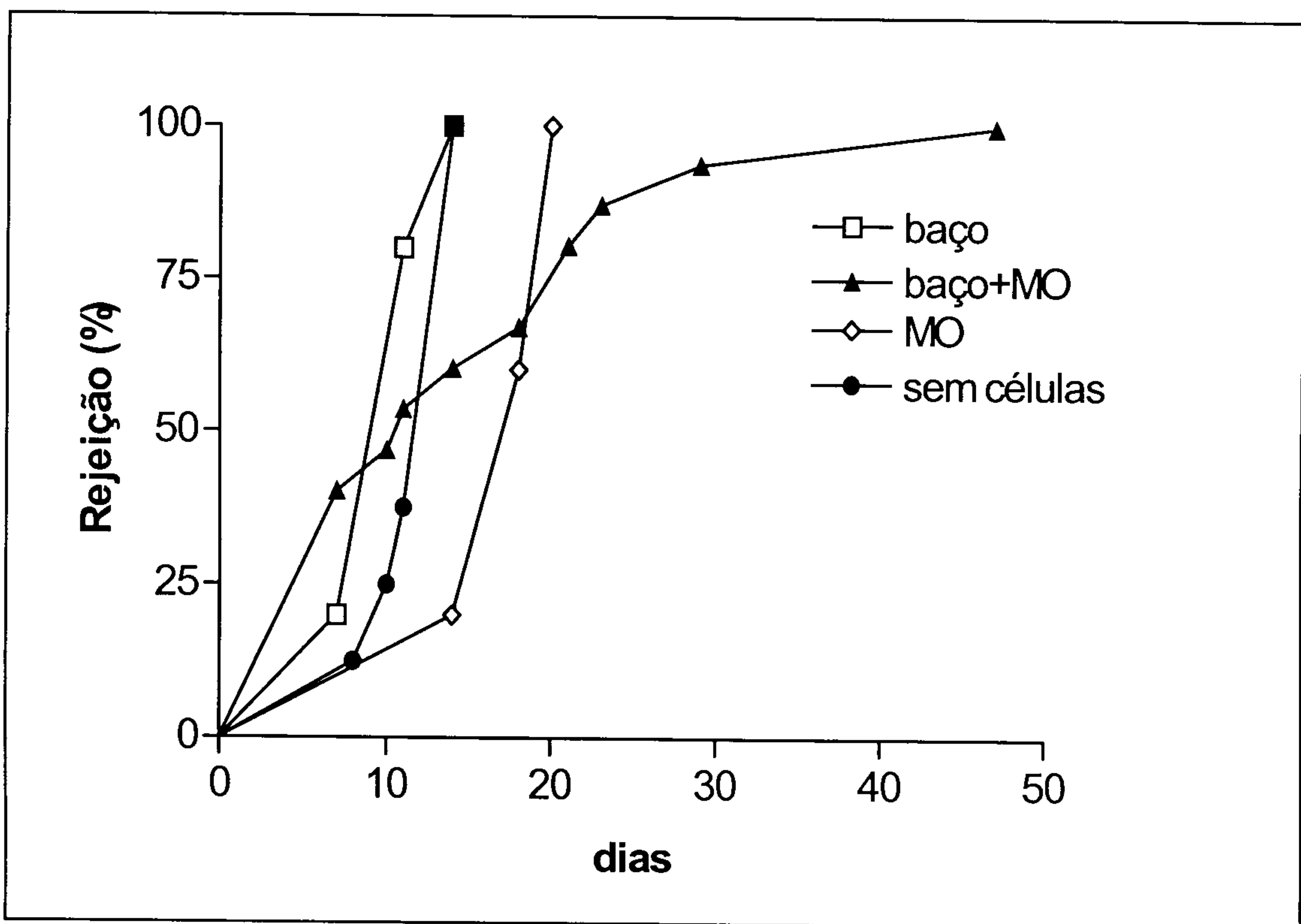


Figura 2. Administração das células de baço junto com as da medula óssea de camundongos (BALB/c x C57BI/6)F1 21 dias antes do transplante aumenta o tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco semi-alogênico em receptores BALB/c. Cinco milhões de células da medula óssea combinada com as de baço (proporção 2:3) ou somente células do baço foram inoculadas em camundongos BALB/c (n=15 ou n=5, respectivamente) 21 dias antes do transplante de coração do doador (BALB/c x C57BI/6)F1. Cada símbolo representa o tempo de sobrevivência do enxerto na população dos camundongos receptores.

4.2. Avaliação do microquimerismo em camundongos transplantados após a infusão das células semi-alogênicas do baço junto com as da medula óssea.

Procurou-se verificar a existência de microquimerismo no timo, no baço, nos linfonodos e na medula óssea dos receptores BALB/c transplantados com o coração de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1, vinte e um dias após a infusão das células da medula óssea junto com as de baço do doador. O microquimerismo foi avaliado pela técnica de PCR semi-quantitativo amplificando-se uma região do H-2^b, em diferentes períodos após o transplante (14, 21, 28 e 35 dias). A Figura 3 ilustra esquematicamente os intervalos de observação do microquimerismo no organismo dos receptores.

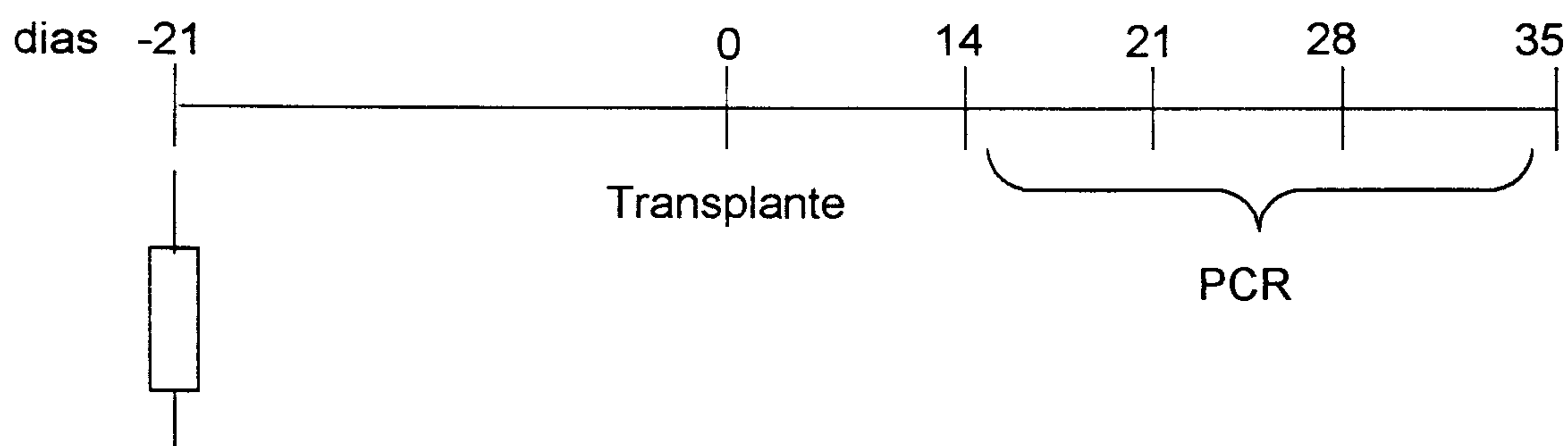


Figura 3. Esquema representativo do regime de observação do microquimerismo nos receptores BALB/c. Camundongos BALB/c inoculados com células semi-alogênicas da medula óssea junto com as de baço e transplantados 21 dias após, foram sacrificados nos dias indicados e averiguados para a presença das células do doador.

Os resultados mostraram o desenvolvimento de microquimerismo em todos os órgãos avaliados, com exceção dos linfonodos (Figura 4). No entanto, quanto à estabilidade desse fenômeno, os histogramas demonstram que na medula óssea (Figura 4A) e no timo (Figura 4C), a densidade das bandas das células semi-alogênicas parece ter se estabilizado entre os dias 28 e 35, de acordo com a quantificação dos produtos de PCR, corrigidos pela densidade da actina em cada amostra.

A quantidade de produtos de PCR (em unidades arbitrárias: UA) na medula óssea variou entre 1,00 e 0,60 UA; no baço a variação foi entre 1,00 e 0,51 UA e no timo, entre 1,00 e 0,22 UA.

Esses resultados mostraram que, muito embora as células do doador estavam presentes pelo menos até o 35º dia após o transplante, não foi determinante para que se instaurasse a tolerância ao enxerto cardíaco, apesar de termos observado um aumento expressivo do tempo de sobrevivência do enxerto em aproximadamente 30% do grupo.

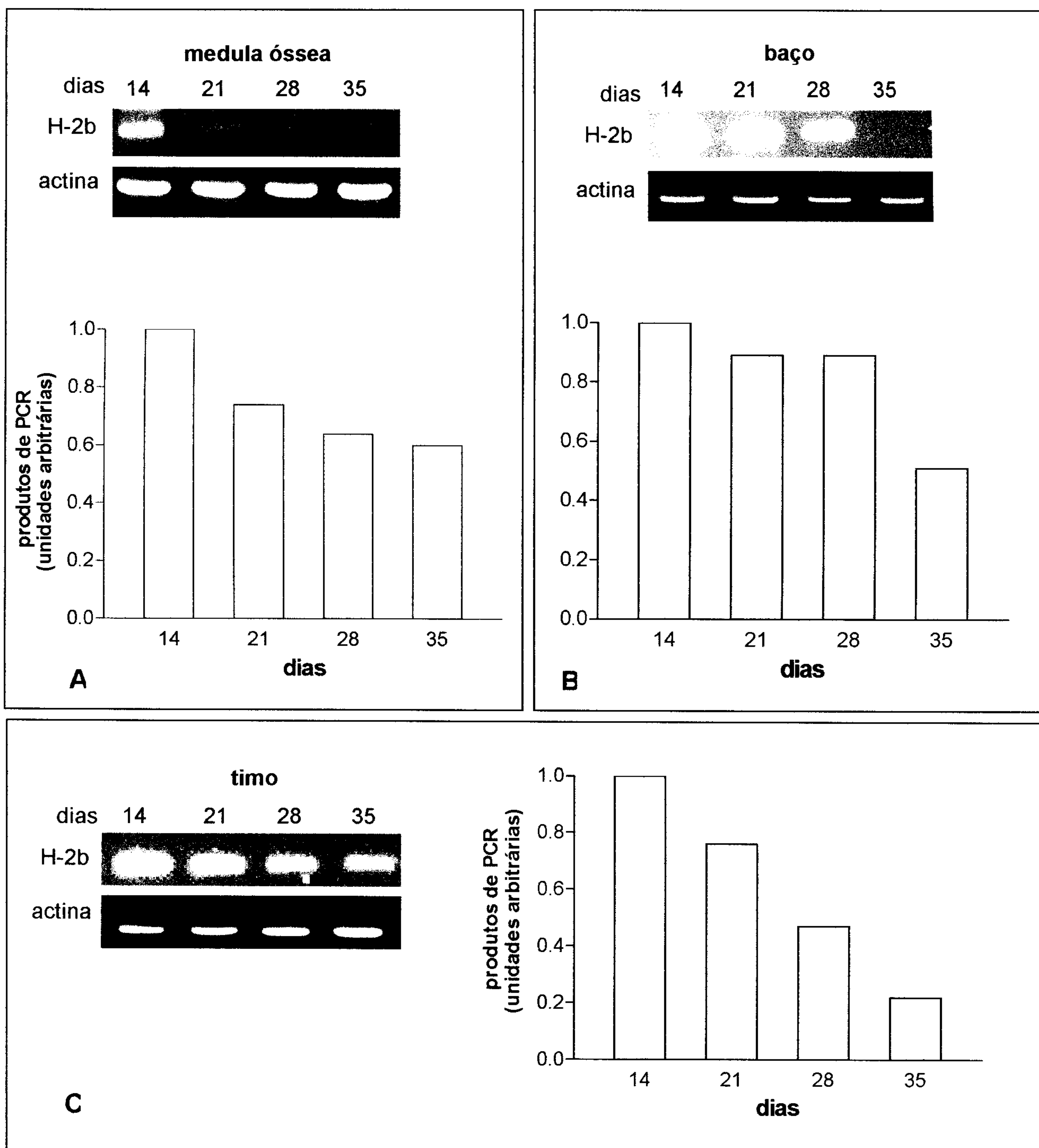


Figura 4. Desenvolvimento de microquimerismo após a administração de células semi-alogênicas da medula óssea junto com as de baço em receptores que foram transplantados. Camundongos BALB/c receberam 5 milhões de células do doador (BALB/c x C57Bl/6)F1 21 dias antes do transplante cardíaco. Os animais foram avaliados quanto à presença das células do doador na medula óssea (A), no baço (B) e no timo (C) nos dias 14, 21, 28 e 35 após o transplante. Os dados dos histogramas foram expressos em unidades arbitrárias de produtos de PCR.

4.3. Estudo dos mecanismos envolvidos na rejeição diferencial do enxerto de pele, transplantada após a inoculação das células do doador.

Observou-se, até o momento, que camundongos BALB/c rejeitaram o enxerto de forma acelerada quando foram previamente tratados com células do baço do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁. O tempo de aceitação do enxerto foi prolongado quando foram introduzidas células da medula óssea à suspensão de células do baço (na proporção 2:3, respectivamente). Diante disso, procurou-se estudar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na rejeição diferencial do enxerto de pele entre os grupos inoculados com as diferentes populações de células semi-alogênicas. Para isso, avaliou-se as subpopulações de células T CD4⁺, T CD8⁺ e B; a expressão das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40L além da resposta proliferativa e produção de citocinas no sobrenadante das mesmas. A avaliação foi realizada no 7º dia após o transplante. A escolha desse dia foi baseada nas observações que estão mostradas na Figura 1 onde 100% de rejeição já ocorria, nesse período, nos animais inoculados com as células semi-alogênica do baço, enquanto que os camundongos previamente infundidos com a mistura de células do baço+medula óssea ainda mantinham a pele íntegra.

4.3.1. Fenotipagem das células do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁

A primeira abordagem, na tentativa de se compreender os fatores envolvidos na rejeição diferencial, foi o estudo das subpopulações de células presentes nos inóculos destinados aos receptores. Para isto, células do baço ou destas em combinação com as células da medula óssea de camundongos F1 foram caracterizadas por citometria de fluxo, quanto à expressão dos seguintes receptores:

CD4, CD8 α , B220, CD11b, CD11c, CD56 (NK) e MHC II (I-A^d).

A fenotipagem da população de células semi-alogênicas do baço (Figuras 5 A e B) mostrou a presença de $0,82 \times 10^6$ (16,5%) células CD4⁺; $0,28 \times 10^6$ (5,7%) células CD8⁺; $0,29 \times 10^6$ (5,97%) células CD11b⁺; $0,0177 \times 10^6$ (36,89%) células CD11c⁺ dentre as CD11b⁺; $0,22 \times 10^6$ (4,32%) células NK; $2,2 \times 10^6$ (43,12%) células B220⁺ e $1,4 \times 10^6$ (28,04%) células MHC II⁺. Em relação à mistura de células da medula óssea e as de baço, os resultados (Figuras 5 A e B) mostraram a presença de $0,58 \times 10^6$ (11,7%) células CD4⁺; $0,2 \times 10^6$ (4,0%) células CD8⁺; $0,31 \times 10^6$ (6,31%) células CD11b⁺; $0,066 \times 10^6$ (21,35%) células CD11c⁺ dentre as CD11b⁺; $0,1 \times 10^6$ (2,11%) células NK; $1,18 \times 10^6$ (23,79%) células B220⁺ e $0,72 \times 10^6$ (14,51%) células MHC II⁺.

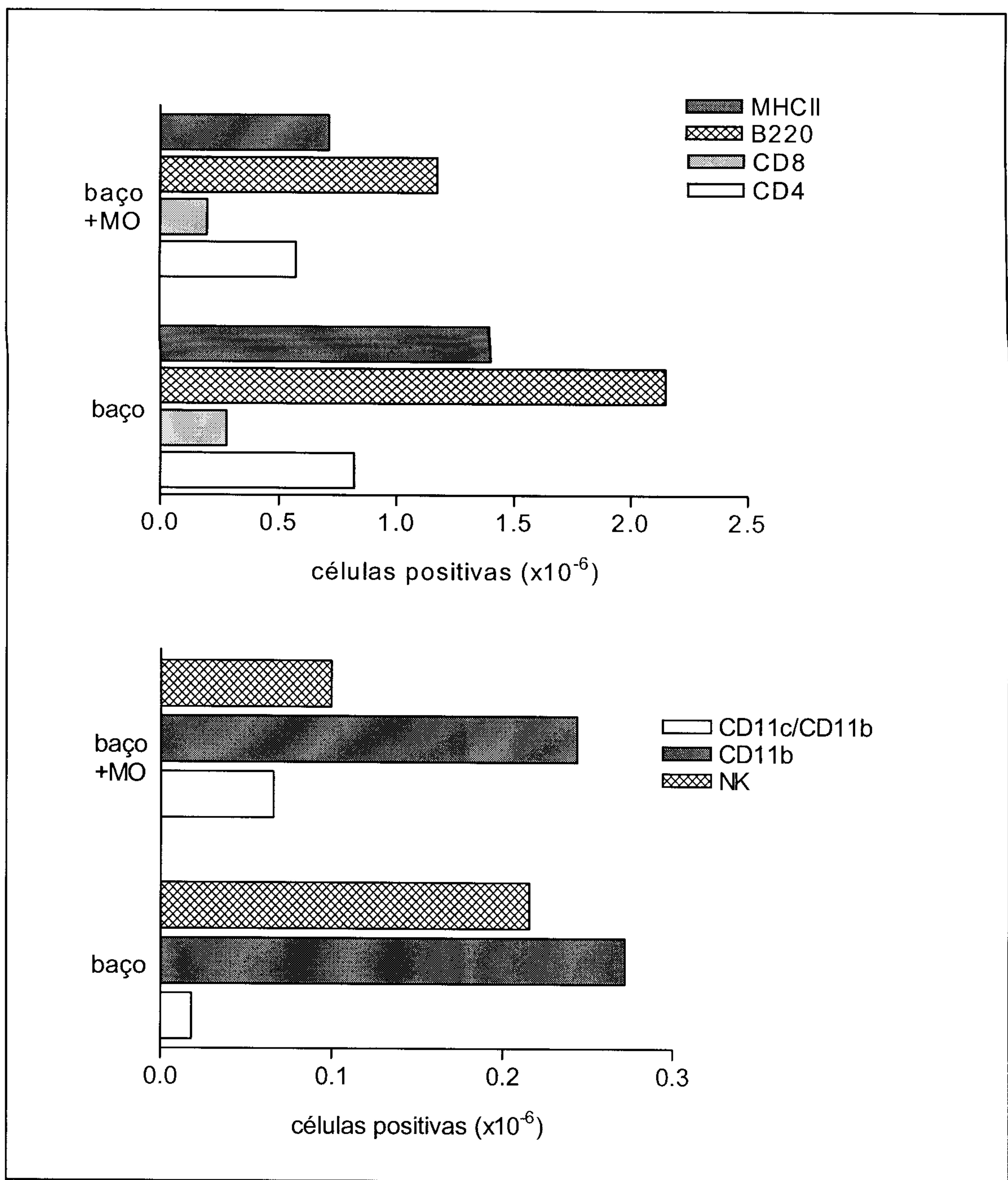


Figura 5. Fenotipagem das populações de células de baço ou destas junto com as células da medula óssea do doador (BALB/c x C57Bl/6)F1. A. expressão dos receptores CD4, CD8, B220 e MHCII nas células de baço ou baço+medula óssea; B. expressão das subpopulações CD11b+, CD11c+/CD11b+ e NK nas células de baço ou baço+medula óssea.

4.3.1. Avaliação das populações celulares e da expressão das moléculas CD28 e CD40L nos camundongos transplantados após a injeção das células do doador.

Com a finalidade de se avaliar a possibilidade de uma expansão diferencial das populações de células T CD4⁺, T CD8⁺ e B, entre os grupos que receberam as células do doador F1 (baço ou baço + medula óssea), além das moléculas CD28 e o ligante de CD40 (CD40L), células do baço de camundongos transplantados, após a administração das células do doador F1, foram marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromo (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-CD28 e anti-CD154) e analisadas por citometria de fluxo, no 7^o dia após o transplante de pele. O percentual de células positivas foi corrigido pelo número total de células presentes no baço de cada indivíduo.

4.3.1.2. Avaliação das populações T CD4⁺, T CD8⁺ e B220⁺

Em relação ao número total de células no baço dos animais, os dados (Figura 6A) mostraram uma expansão dessas células (em milhões) nos animais previamente inoculados com células do baço do doador F1 (197,4±18,5) em relação aos demais grupos (139,8±27,4 no grupo que recebeu as células do baço com as da medula óssea: $P < 0,01$; 140,8±5,9 no controle transplantado: $P < 0,05$ e 126,3±16,4 nos animais naïve: $P < 0,01$). A análise das populações celulares T CD4⁺ e T CD8⁺ (em milhões) (Figura 6B) demonstrou que, embora a expansão das células T CD4⁺ no grupo que recebeu células do baço (54,7±3,6) tenha sido significativa somente em relação aos animais normais (30,7±3,5; $P < 0,01$), estas apresentaram uma tendência ao aumento em relação ao grupo inoculado com as células do baço com as da medula óssea (45,7±13,6) e ao grupo controle (45,7±6,3). A população de células T CD8⁺ também aumentou significativamente em todos os grupos (36,0±6,9 no grupo que recebeu

células do baço; $29,3 \pm 5,3$ no grupo inoculado com células do baço com as da medula óssea e $36,3 \pm 2,9$ no grupo controle) em relação ao grupo de animais naïve ($18,9 \pm 4,3$; $P < 0,01$ ou $P < 0,05$). O grupo que recebeu o inóculo das células de baço de F1 apresentou uma tendência ao aumento dessa população em relação ao grupo administrado com as células do baço combinadas às da medula óssea.

Em relação às células B (B220⁺), o aumento desse compartimento celular (em milhões) foi significativo no grupo previamente inoculado com células de baço ($73,4 \pm 5,6$) em relação aos animais que receberam células do baço com as da medula óssea ($53,1 \pm 16,0$; $P < 0,05$) e quando comparado aos demais ($48,6 \pm 5,3$ no grupo controle e $40,2 \pm 3,9$ no grupo de animais naïve; $P < 0,01$).

Juntos, esses resultados sugerem que existe, entre os grupos, uma expansão diferencial das células esplênicas dos camundongos transplantados e que a população alvo é preferencialmente a das células B. Em relação ao compartimento T, os resultados também mostraram que embora não significativo, o grupo infundido com células do baço apresentou tendência à expandir as populações T CD4⁺ e CD8⁺ em relação ao grupo inoculado com células do baço combinadas às da medula óssea.

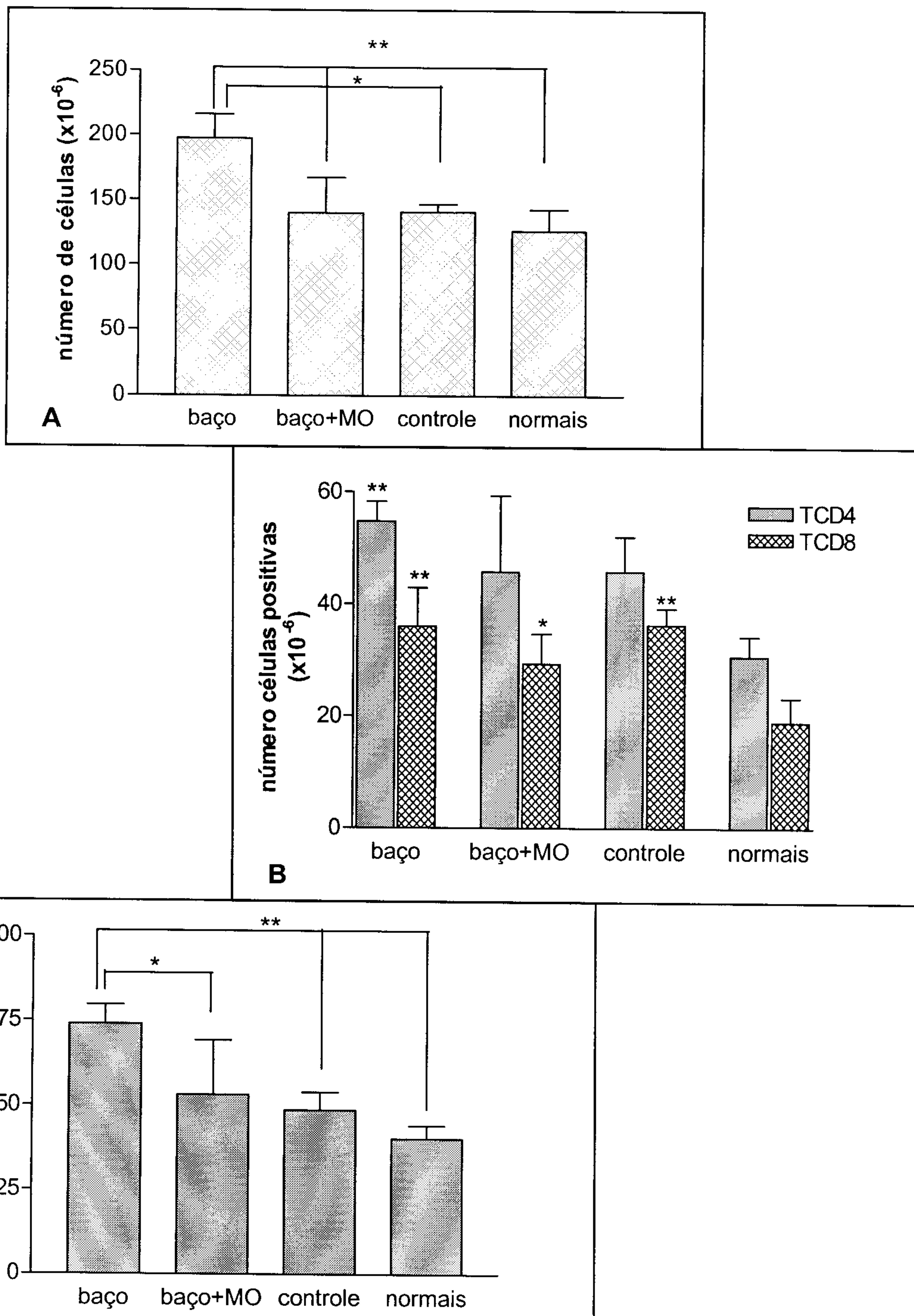


Figura 6. Avaliação da expansão diferencial das populações de células T CD4+, T CD8+ e B220+ em camundongos BALB/c após o transplante de pele. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. No 7º dia após o transplante, as células do baço dos receptores (n=5/ponto; *naïve*: e controle n=3) foram analisadas quanto ao seu número total (A) ou quanto à presença da molécula de CD4 ou CD8 (B) ou ainda B220 (C). Cada barra representa a média \pm o desvio padrão do número total de células esplênicas. * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$ em relação aos animais *naïve* (em B).

4.3.1.2. Avaliação da expressão das moléculas CD28 e CD40L nas células T CD4⁺ e T CD8⁺.

O estudo da população T CD4⁺CD28⁺ (Figura 7A) mostrou que, dentre os grupos avaliados, não houve diferenças quanto ao número de linfócitos positivos (13,6±5,1 milhões no grupo que recebeu células do baço; 13,6±3,2 milhões nos animais que receberam células do baço+medula óssea; 10,0±2,5 milhões no grupo controle e 12,1±3,6 milhões no grupo dos animais *naïve*). Não foi observado aumento da expressão do CD28 em nenhum dos grupos; a variação da média de intensidade de fluorescência (MIF) dessa molécula foi entre 52,2±4,2 e 57,9±7,0 (dados não representados).

Quanto à população T CD8⁺CD28⁺ (Figura 7A), os animais inoculados com células semi-alogênicas do baço apresentou um aumento, porém não significativo, dessa população (em milhões de células) (14,3±3,2) em relação ao grupo administrado com células do baço com as da medula óssea (9,8±2,8) e ao controle (9,5±4,2); no grupo dos camundongos *naïve*, o número de células positivas estava significativamente diminuído (7,0±2,4) quando comparado ao primeiro grupo (baço). Não houve aumento da expressão da molécula em nenhum dos grupos avaliados, sendo que a variação da média de intensidade de fluorescência foi de 49,8±2,2 a 58,2±9,9 (dados não representados).

A expressão do CD40L na população de células T CD4⁺ (Figura 7C) (avaliada pelo número de células positivas, em milhões) não se mostrou diferente dentre os grupos de animais que receberam o transplante (25,3±5,7 no grupo inoculado com as células de baço; 22,5±4,5 no grupo que recebeu a combinação de células do baço com as da medula óssea e 22,4±0,8 nos animais controle). No entanto, quando comparada ao grupo de camundongos *naïve* (7,4±5,1), essa população mostrou-se

significativamente aumentada em todos os grupos ($P < 0,001$, $P < 0,01$ e $P < 0,05$ nos grupo inoculados com as células do baço, essas com as da medula óssea e o grupo controle, respectivamente). Quanto à população T CD8⁺, o mesmo fenômeno foi observado; isto é, não houve diferenças quanto ao número de células T CD8⁺CD40L⁺ entre os grupos de animais transplantados (14,6 \pm 2,1 no grupo infundido com as células do baço; 12,9 \pm 3,5 no grupo que recebeu a combinação de células do baço+medula óssea e 16,0 \pm 1,3 no grupo controle), mas em todos eles, essa população estava aumentada em relação ao grupo de camundongos *naïve* (6,2 \pm 3,7; $P < 0,01$).

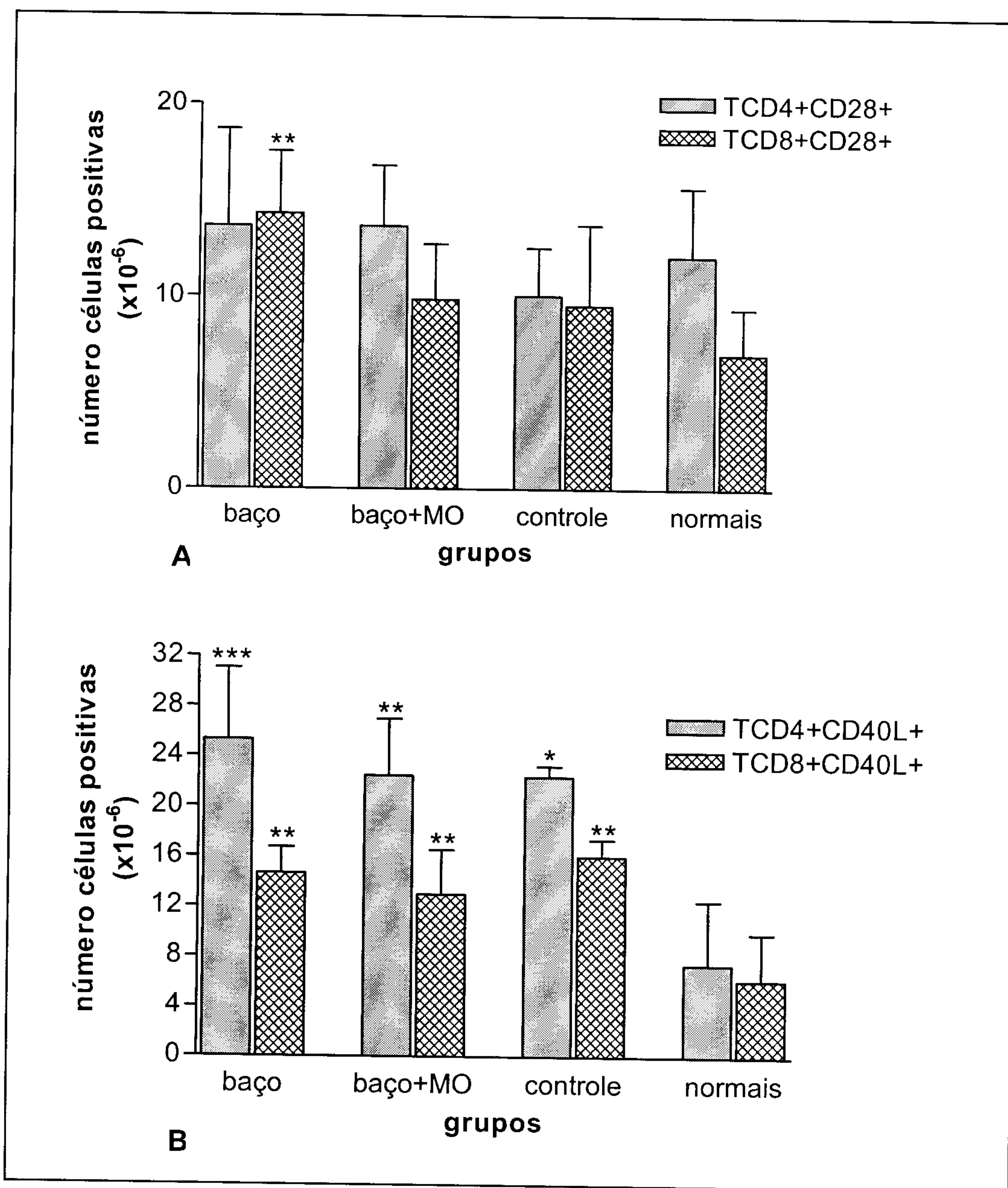


Figura 7. Avaliação da expressão diferencial das moléculas CD28 e CD40L nas populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em camundongos BALB/c após o transplante de pele. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador F1 na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. No 7^o dia após o transplante, as células do baço dos receptores (n=5/ponto; controle n=3) foram analisadas quanto ao número de células CD4+CD28+ e CD8+CD28+ (A) ou quanto ao número de células CD4+CD40L+ e CD8+CD40L+ (B). Cada barra representa a média \pm o desvio padrão do número total de células esplênicas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ ou *** $P < 0,001$ em relação aos animais *naïve*.

4.3.2. Avaliação da resposta proliferativa das células de camundongos transplantados após a administração das células semi-alogênicas.

Com o intuito de se verificar a existência de um diferencial de resposta proliferativa das células dos animais transplantados, frente aos antígenos do doador, células do baço de camundongos BALB/c que rejeitaram o enxerto de pele, foram co-cultivadas com células irradiadas de baço do doador ou de camundongos singênicos (Figura 8). Células do baço de camundongos que receberam somente enxerto semi-alogênico e dos animais *naïve* também foram cultivadas nas mesmas condições.

Os resultados mostraram que o grupo inoculado com as células do baço, combinadas às da medula óssea, apresentou resposta proliferativa significativamente mais elevada, frente aos antígenos do doador ($13854,5 \pm 2964,5$ com; $P < 0,01$), quando comparado aos demais grupos ($6389,1 \pm 4144,5$ cpm no grupo que recebeu as células do baço; $7852,4 \pm 3153,9$ cpm no grupo controle e $7222,3 \pm 1752,6$ cpm no grupo de animais *naïve*). Em todos os grupos, a resposta proliferativa nas culturas singênicas variou de $1411,7 \pm 505,7$ a $1675,1 \pm 814,5$ cpm.

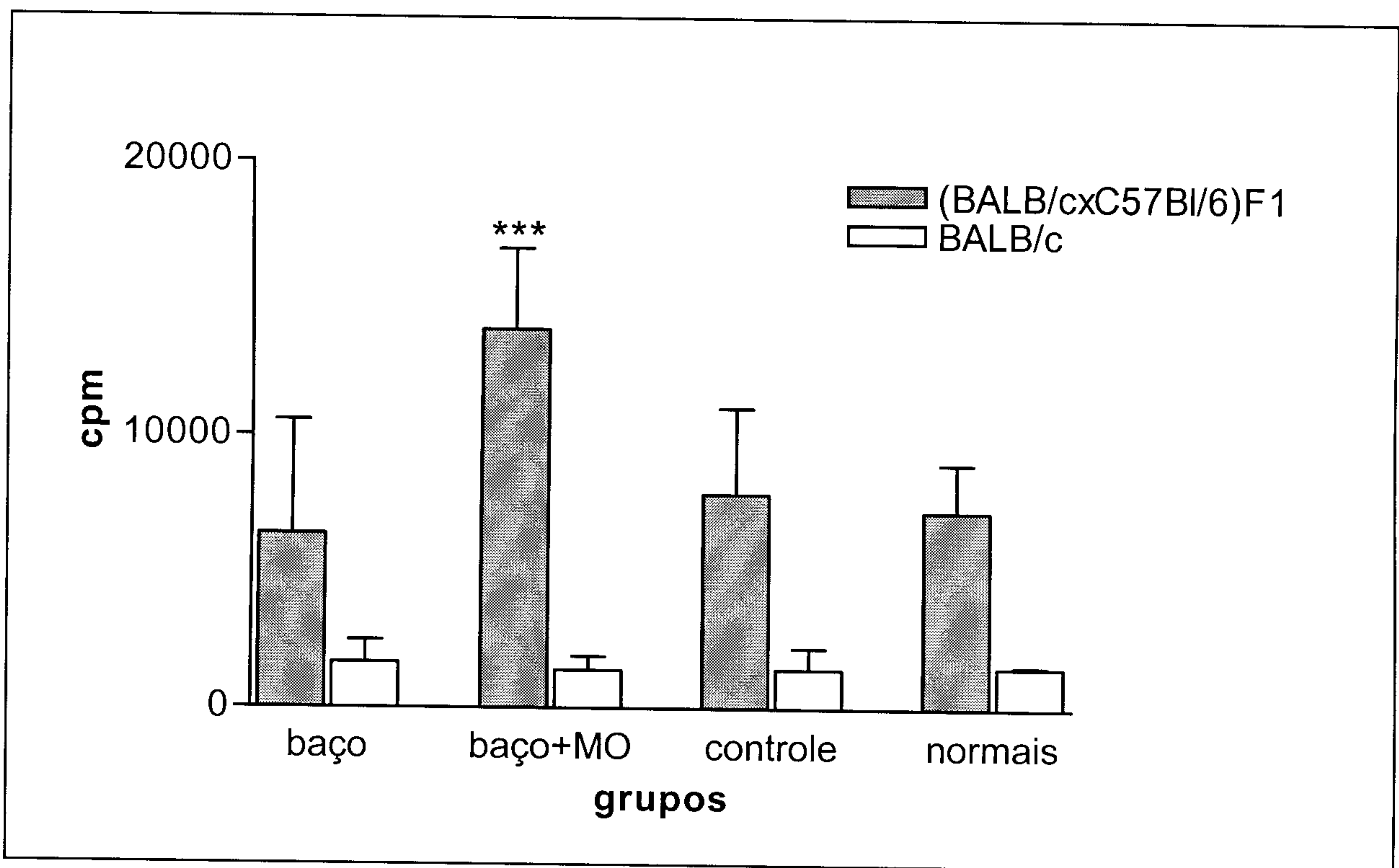


Figura 8. Resposta proliferativa das células de baço de camundongos BALB/c transplantados após a infusão das células da medula óssea+baço ou somente as do baço de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1. Células ($2,5 \times 10^5$) do baço dos camundongos receptores ($n=5$ /grupo) ou dos animais normais foram cultivadas com células irradiadas do baço de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1 ou com células singênicas na proporção 1:1 em placa de 96 poços fundo U por 5 dias. A avaliação da resposta proliferativa foi analisada em cpm. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão; *** $P<0,001$ em relação aos demais frente ao estímulo alogênico.

4.3.3 Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura mista das células do baço de animais transplantados .

Investigou-se a produção de citocinas pelas células esplênicas dos camundongos BALB/c transplantados, após a injeção de células do doador F1, ou destas em combinação com as da medula óssea. Para isso, células do receptor BALB/c foram co-cultivadas com células irradiadas do baço de camundongos F1, ou células autólogas, por 96 horas. As citocinas avaliadas no sobrenadante da cultura foram as seguintes: IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10.

Os resultados mostraram que a produção da IL-2 (Figura 9A) no sobrenadante da cultura mista (F1) estava significativamente aumentada no grupo de animais naïve ($3470,1 \pm 497,5$ pg/ml; $P < 0,001$) em relação aos demais grupos ($P < 0,01$ em relação ao grupo que recebeu células do baço). A secreção dessa citocina no sobrenadante da co-cultura das células esplênicas dos animais inoculados com as células do baço do doador ($2104,0 \pm 173,6$ pg/ml) foi maior comparada ao grupo controle ($868,2 \pm 349,9$; $P < 0,01$). Nas culturas singênicas, a produção da IL-2 variou entre $462,2 \pm 252,2$ e $485,2 \pm 90,2$ pg/ml. Em relação à IL-4, não houve diferenças entre os grupos quanto à sua produção, sendo que a variação da mesma foi entre $26,02 \pm 14,4$ e $20,2 \pm 16$ pg/ml nos ensaios alogênicos e $0,1 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 1,6$ nos singênicos (dados não mostrados).

Os dados relativos à produção do IFN- γ (Figura 9B) mostraram um aumento significativo dessa citocina em todos os grupos transplantados ($22,5 \pm 3,2$ ng/ml no grupo inoculado com as células de baço; $28,1 \pm 11,4$ ng/ml no grupo que recebeu células de baço com as da medula óssea e $30,3 \pm 7,2$ ng/ml no grupo controle) quando comparados aos animais naïve ($5,6 \pm 0,5$ ng/ml) frente ao estímulo semi-alogênico. Nas culturas singênicas, a variação entre os grupos foi de $0,001 \pm 0,0$ a $2,5 \pm 2,9$ ng/ml.

Em relação a IL-10, os animais que receberam células semi-alogênicas do

baço junto com as da medula óssea apresentaram um aumento na produção desta citocina ($136,2 \pm 73,4$ pg/ml) quando comparados aos demais grupos ($66,4 \pm 31,6$ pg/ml no grupo "baço", $P < 0,05$; $70,02 \pm 40,3$ pg/ml no grupo controle, $P < 0,01$ e $30,8 \pm 18,4$ pg/ml no grupo normal, $P < 0,001$) frente à estimulação das células de camundongos F1. Nas culturas de células singênicas, a variação da produção da IL-10, entre os grupos, foi de $29,6 \pm 26,2$ a $11,5 \pm 8,3$ pg/ml.

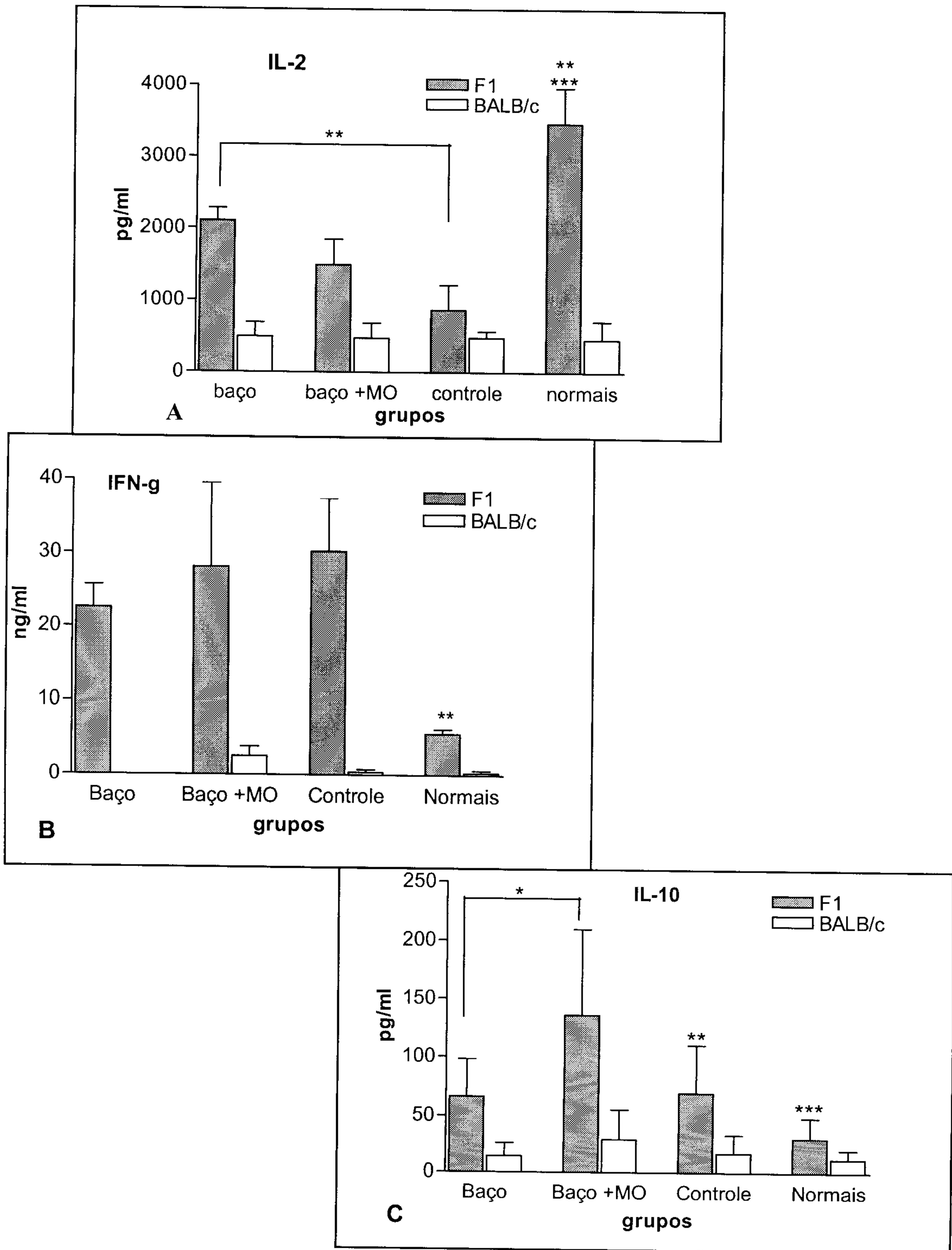


Figura 9. Avaliação da produção de IL-2, IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de cultura mista e dos ensaios singênicos de baço de camundongos BALB/c após o transplante de pele. Células ($3,0 \times 10^6$) do baço dos camundongos receptores ($n=5$ /grupo) ou dos camundongos *naïve* foram cultivadas com células irradiadas do baço de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1 ou com células singênicas na proporção 1:1 em placa de 24 poços por 96 horas. A avaliação da produção das citocinas foi realizada no sobrenadante. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ ou *** $P < 0,001$ (em C os dois últimos são em relação ao grupo “baço+MO”).

4.4. Estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na reatividade às células semi-alogênicas na ausência do transplante.

O prolongamento do enxerto, observado nos animais transplantados após receberem células semi-alogênicas da medula óssea juntamente com as de baço, sugere que as células da medula óssea poderiam modular o sistema imune do receptor de modo a diminuir a resposta das células aloreativas, no intervalo entre a inoculação e o transplante. Portanto, resolveu-se investigar os possíveis mecanismos envolvidos nessa suposta modulação, em diferentes momentos do período que antecede o transplante, através das seguintes abordagens:

1. Estabelecimento do microquimerismo;
2. Cinética da expressão das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40;
3. Envolvimento das populações de células T CD4⁺, T CD8⁺, B através da expansão do seu compartimento;
4. Resposta proliferativa das células de baço de camundongos normais BALB/c contra células semi-alogênicas da medula óssea.

4.4.1. Estabelecimento do microquimerismo.

Com o objetivo de se verificar o padrão de migração das células do baço junto com as da medula óssea do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁ no organismo de camundongos BALB/c, cinco milhões de células foram marcadas com CFDA-SE e infundidas pela veia da cauda do receptor. Quatro pontos foram arbitrariamente selecionados para a observação do padrão migratório das mesmas nas primeiras 72 horas: 2, 5, 24 e 72 horas. Os controles receberam as células semi-alogênicas não marcadas. Em diferentes períodos após a infusão, a presença da célula do doador foi avaliada no baço, na medula óssea, no timo, no fígado e nos linfonodos axilares e

inguinais por citometria de fluxo (Figura 10).

Em outros experimentos, o microquimerismo foi avaliado pela técnica de PCR a partir do 35º dia após a administração endovenosa das células semi-alogênicas do baço junto com as da medula óssea (Figura 11).

Os resultados mostram que, na fase aferente, isto é, logo após a inoculação das células semi-alogênicas, estas migraram inicialmente e substancialmente para o baço ($0,55 \pm 0,00\%$). Nos demais órgãos, as células do doador foram encontradas em proporções muito semelhantes ($0,08 \pm 0,01\%$ nos linfonodos; $0,07 \pm 0,01\%$ na medula óssea e $0,06 \pm 0,00\%$ no fígado). Cinco horas após a infusão, as células continuavam em grande número no baço ($0,5 \pm 0,05\%$), mantiveram o percentual inicialmente observado nos linfonodos ($0,1 \pm 0,00\%$) e na medula óssea ($0,055 \pm 0,01\%$) e diminuíram no fígado ($0,025 \pm 0,01\%$). No período de 24 horas, as células semi-alogênicas foram reduzidas à metade ($0,26 \pm 0,04\%$) no baço; mantiveram-se estáveis na medula óssea e nos linfonodos e não foram mais detectadas no fígado. Setenta e duas horas após a infusão, as células foram encontradas em menores quantidades no baço ($0,06\%$), na medula óssea e nos linfonodos ($0,02\%$). Em nenhum momento da cinética foram observadas células do doador no timo.

Na fase tardia (Figura 11), o desenvolvimento do microquimerismo, avaliado pela técnica de PCR semi-quantitativo, foi mostrado na medula óssea (Figura 11A) e no baço (Figura 11B) dos receptores apenas nos dois primeiros pontos da cinética (35º e 42º dias), enquanto que no timo (Figura 11C), as células semi-alogênicas foram encontradas durante todo o período da avaliação. A variação dos níveis de microquimerismo, quantificados por produtos de PCR (em unidades arbitrárias: UA), na medula óssea (1,00 e 0,82 UA) no baço (0,87 e 1,00 UA) e no timo (1,00 a 0,80 UA) foi praticamente a mesma. No entanto, o intervalo em que foram encontradas as células

do doador foi maior no timo (35 a 56 dias) em relação aos demais órgãos, nos quais o microquimerismo foi observado somente até o 42º dia. Não foram encontradas células do doador nos linfonodos.

Juntos, os resultados mostraram que as células semi-alogênicas foram capazes de se alojar nos linfonodos (até 72 horas as células ainda estavam presentes), no baço e na medula óssea por 42 dias, enquanto que no timo do receptor, as células persistiram durante todo o tempo da avaliação (até 56 dias), apesar de não terem sido detectadas nas primeiras 72 horas pelo método da citometria de fluxo. A avaliação destas células na fase tardia mostrou uma tendência das mesmas a diminuir em quantidade. O fato de não termos encontrado células, pelo método da citometria de fluxo, nesse órgão, pelo menos nas primeiras 72 horas após a infusão pode significar que o número de células aptas a se nidarem tenha sido, provavelmente, muito pequeno, e, portanto, não detectáveis por essa técnica. Esses dados também mostraram que as células do doador estavam presentes no momento em que foi realizado o transplante.

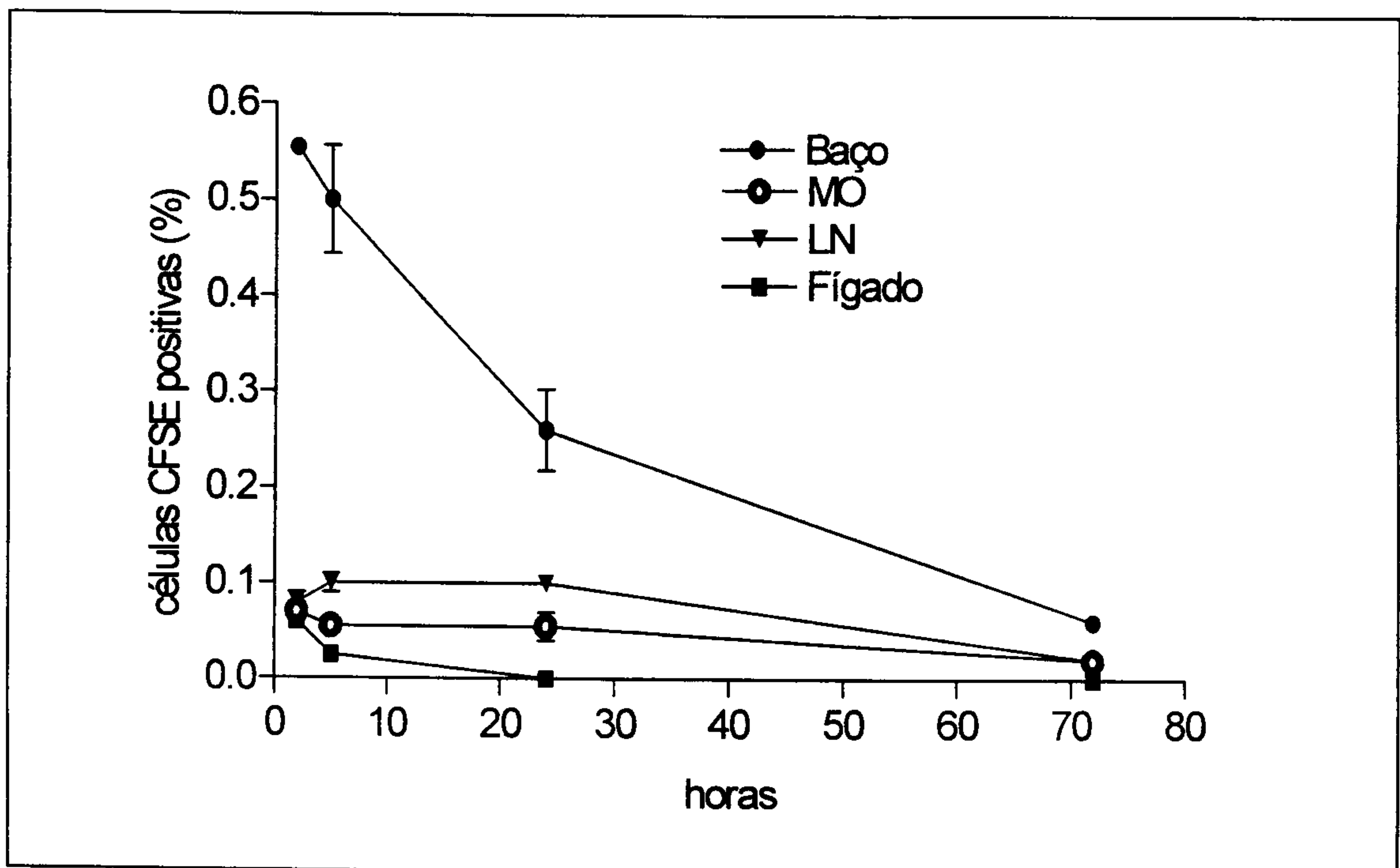


Figura 10. Cinética de migração das células de baço com as da medula óssea do doador (BALB/c x C57BL/6)F1 em receptores BALB/c após a infusão. Cinco milhões de células do baço e da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram marcadas ou não com CFSE, infundidas e.v. (5×10^6 células) e analisadas no baço, timo, na medula óssea e nos linfonodos axilares e inguinais dos camundongos receptores (n=2) em diferentes tempos após a infusão por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão da porcentagem de células CFSE positivas presentes em cada tecido.

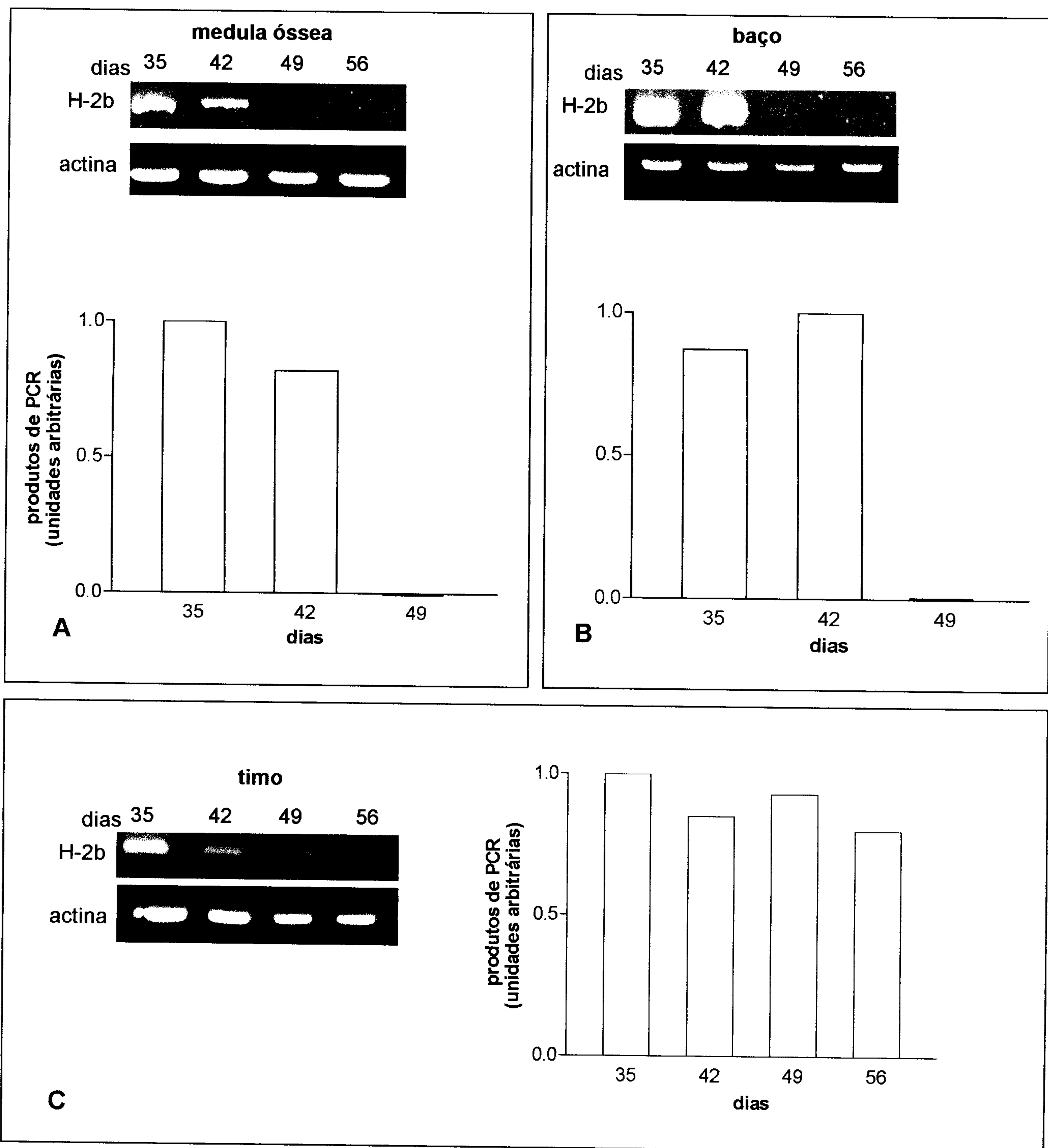


Figura 11. Desenvolvimento de microquimerismo após a administração de células semi-alogênicas da medula óssea junto com as de baço em receptores não transplantados. Camundongos BALB/c receberam 5 milhões de células do baço junto com as da medula óssea do doador (BALB/c x C57Bl/6)F1. Os animais foram avaliados quanto à presença das células do doador na medula óssea (A), no baço (B) e no timo (C) a partir do 35º dia após a infusão das células. Os dados dos histogramas foram expressos em unidades arbitrárias de produtos de PCR.

4.4.2. Avaliação das populações celulares e da expressão de moléculas de ativação das células T do receptor em diferentes tempos após a infusão das células semi-alogênicas.

Com o intuito de se estudar o processo diferencial de ativação das células do receptor pelas células semi-alogênicas, camundongos BALB/c foram inoculados, pela via endovenosa, com 5 milhões de células do baço ou destas com as da medula óssea, provenientes dos doadores (BALB/c x C57Bl/6) F_1 . Os pontos da cinética selecionados para a avaliação foram: 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a administração das células semi-alogênicas. Em cada período, as células do baço foram avaliadas quanto à expressão das seguintes moléculas: CD4, CD8, CD28, CD40L e B220 (nos tempos de 14 e 21 dias), através da citometria de fluxo. O percentual de células positivas foi corrigido pelo número total de células esplênicas da respectiva amostra.

4.4.2.1. Avaliação do número de células totais do baço

A cinética do número total de células do baço (em milhões) (Figura 12) mostrou que o grupo que recebeu as células do baço com as da medula óssea, apresentou um aumento gradativo, porém não significante, em número, até o sétimo dia ($103,2 \pm 40,25$ no 1º dia; $139,0 \pm 15,7$ no 3º dia e $165,6 \pm 39,0$ no 7º dia; $P < 0,01$ em relação ao grupo de animais *naïve* nesse último) ao contrário dos animais que receberam células do baço ($144,6 \pm 37,0$ no 1º dia; $125,3 \pm 8,4$ no 3º dia e $108,6 \pm 20,8$ no 7º dia). Nos dois últimos pontos da cinética, os camundongos inoculados com a suspensão mista de células (baço+medula óssea) apresentaram redução na quantidade de células esplênicas ($138,6 \pm 27,2$ e $100,2 \pm 4,5$) enquanto que o grupo administrado com células do baço, apresentou uma tendência ao aumento da população de células esplênicas ($103,2 \pm 20,0$ e $135,5 \pm 16,17$ nos dias 14 e 21, respectivamente).

Em relação ao número de células do baço no grupo de animais *naïve* ($87,9 \pm 8,2$

x10⁶), os animais que receberam as células semi-alogênicas do baço com as da medula óssea apresentaram um valor muito próximo a esse no tempo de 24 horas e no 21^o dia após a inoculação. Nesses mesmos dias, a quantidade de células esplênicas no grupo dos animais inoculados com as células do baço apresentou uma tendência ao aumento quando comparados aos camundongos *naïve*.

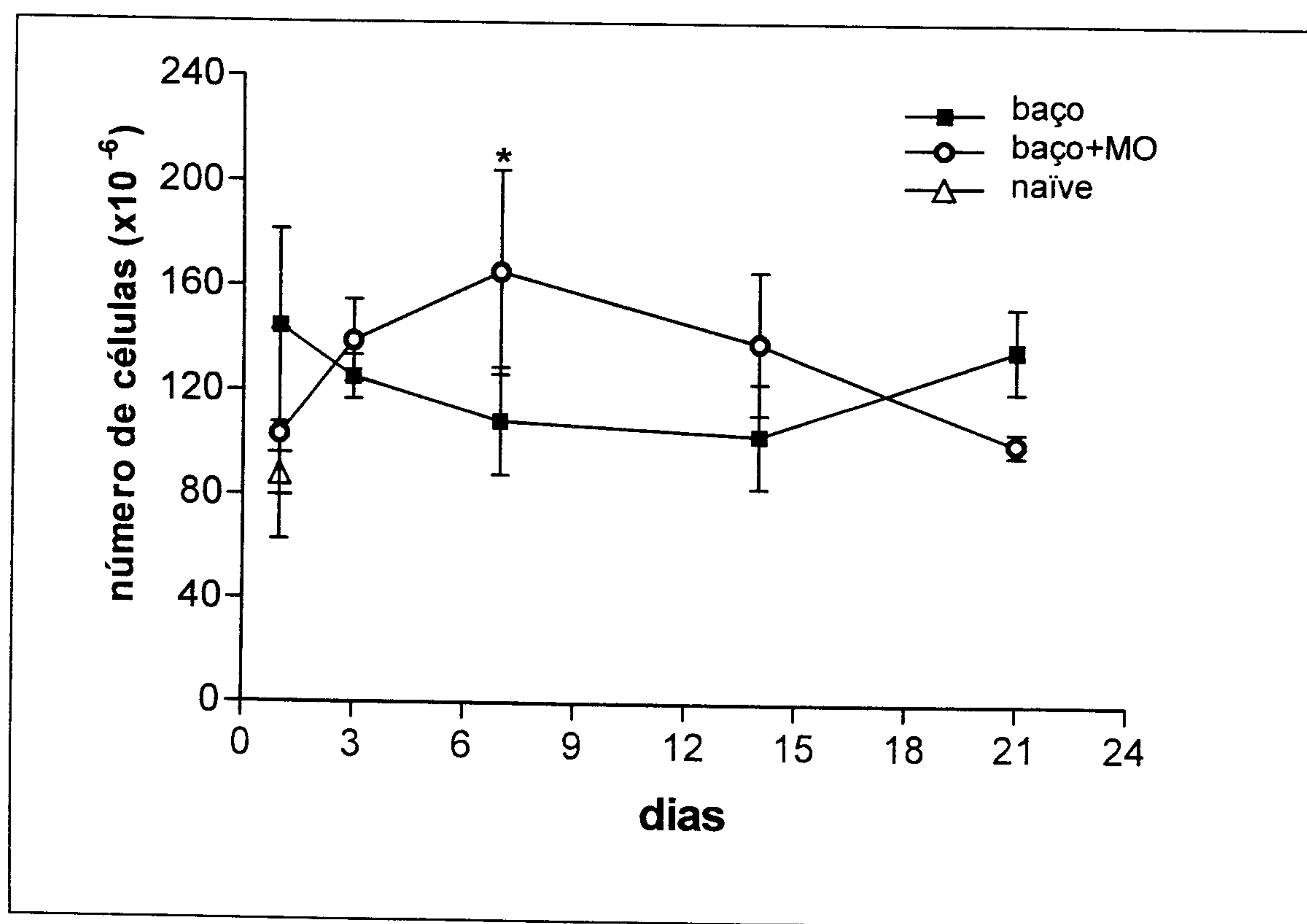


Figura 12. Número de células totais no baço de camundongos BALB/c após a administração de células semi-alogênicas do baço ou destas junto com as da medula em diferentes períodos. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. Em diferentes tempos após a infusão, as células do baço dos receptores (n=3/ponto; *naïve*: n=6) foram analisadas quanto ao seu número. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão do número total de células esplênicas. * $P < 0,01$ em relação aos animais *naïve*.

4.4.2.2. Avaliação das populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺

A fim de se avaliar a influência das subpopulações de células T CD4⁺ e T CD8⁺, na suposta ativação das células do receptor pelas diferentes populações de células semi-alogênicas, células do baço dos camundongos BALB/c, previamente inoculados, foram caracterizados quanto à expressão das moléculas CD3/CD4 ou CD3/CD8.

Os resultados (em milhões de células) mostraram que a população T CD8⁺ (Figura 13A) diminuiu significativamente ($P < 0,05$) no 14^o dia ($11,3 \pm 1,3$) após a administração de células do baço do doador F1, em relação ao tempo de 24 horas ($24,7 \pm 4,6$). No dia 21, o aumento também foi significativo ($P < 0,05$; $24,6 \pm 5,16$) em relação ao dia 14.

Ao contrário da dinâmica observada no grupo que recebeu as células esplênicas, o número de células T CD8⁺ do baço dos camundongos BALB/c inoculados com a população mista (células do baço+medula óssea) se manteve praticamente constante durante todo o período observado ($17,5 \pm 6,6$ no dia 1; $19,8 \pm 2,15$ no dia 3; $20,7 \pm 3,06$ no dia 7; $17,1 \pm 5,4$ no dia 14 e $12,3 \pm 1,5$ no dia 21). No último dia (21), o número de células foi muito próximo ao dos animais normais ($14,8 \pm 5,1$) e menor em relação ao grupo dos animais administrados com as células do baço do doador ($P < 0,01$).

Esses resultados mostraram que as células T CD8⁺ apresentaram uma dinâmica diferente entre os grupos, quanto ao tamanho da população, sendo que no 21^o dia a diferença no número de células positivas foi significativa e pode ser relevante no curso da rejeição diferencial dos órgãos transplantados nesse dia.

Em relação às células T CD4⁺ (Figura 13B), o grupo que recebeu células do baço com as da medula óssea mostrou uma tendência ao aumento em seu número

(em milhões) até o 7º dia ($29,2 \pm 11,2$ no dia 1; $33,8 \pm 6,8$ no dia 3 e $41,4 \pm 8,5$ no dia 7) ao passo que a dinâmica observada no grupo dos animais inoculados com células do baço apresentou tendência à diminuir o número dessas células ($39,8 \pm 8,7$ no dia 1; $33,2 \pm 1,8$ no dia 3 e $29,3 \pm 3,6$ no dia 7). Nos dias 3 e 14, o valor em ambos os grupos foi muito próximo ($33,2 \pm 1,8$ e $33,8 \pm 6,8$ no 3º dia e $25,8 \pm 5,7$ e $29,4 \pm 6,2$ no 7º dia no grupo inoculado com as células do baço e naqueles que receberam a mistura de células do baço e da medula óssea, respectivamente). No dia 21, a quantidade de células T CD4⁺ se manteve próxima ao ponto anterior ($32,5 \pm 5,4$ nos animais que receberam células do baço e $23,9 \pm 3,7$ nos inoculados com a mistura de células do baço com as da medula óssea).

Os resultados mostraram que a população de células T CD4⁺ apresentou uma dinâmica similar à das T CD8⁺ nos dois grupos, com a diferença de que no 21º dia, o número de células T CD8⁺ no grupo de animais inoculados com as células de baço foi significativamente maior em relação àqueles que receberam as células do baço com as da medula óssea, aspecto esse não observado para a população T CD4⁺.

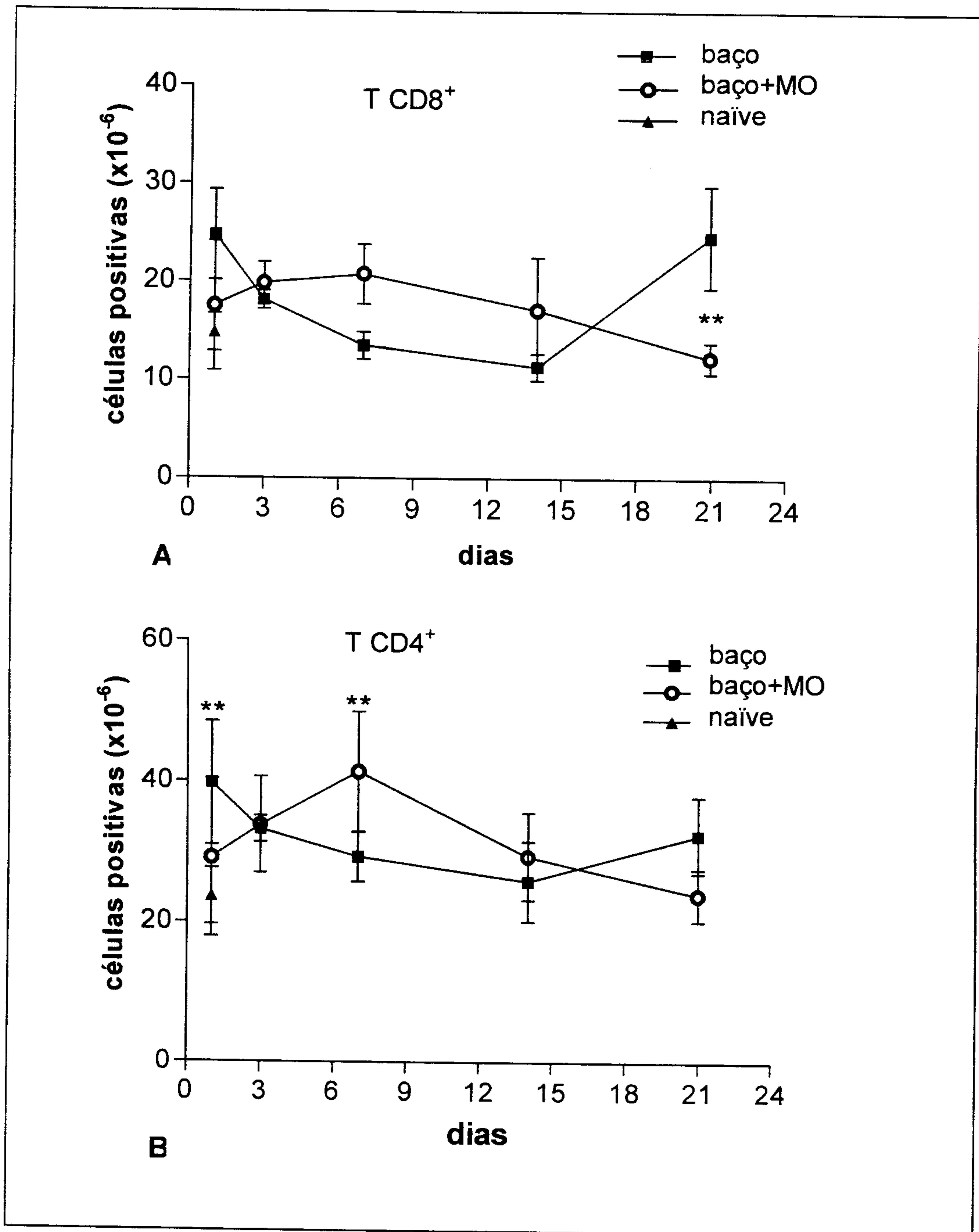


Figura 13. Número de células T CD8⁺ e T CD4⁺ no baço de camundongos BALB/c após a administração de células semi-alogênicas do baço ou destas junto com as da medula em diferentes períodos. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. Em diferentes tempos após a infusão, as células do baço dos receptores (n=3/ponto; *naïve*: n=7) foram analisadas quanto ao número de células T CD8⁺ (A) e T CD4⁺ (B). Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão do número total de células positivas. ** $P < 0,01$ em relação ao grupo "B+M" no dia 21 (em A) ou aos *naïve* (em B).

4.4.2.3. Avaliação da população de células T CD4⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28⁺

A cinética da expressão da molécula co-estimuladora CD28 foi avaliada nas populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos BALB/c após a inoculação das células semi-alogênicas. Os resultados (em milhões de células) mostraram que a população de células T CD4⁺CD28⁺ (Figura 14A) no grupo inoculado com as células de baço do doador estava aumentada (22,9±4,5) em relação aos animais *naïve* (14,3±2,6) ($P<0,05$), nas primeiras 24 horas. Essa população apresentou uma queda em seu número no dia 3 (12,4±1,5), aproximando-se ao do grupo controle, e se manteve em quantidades muito similares do 7^o ao 21^o dia (18,3±2,8 no dia 7; 20,4±4,8 no dia 14 e 19,2±6,9 no 21^o dia). Ao contrário do observado, a quantidade de células T CD4⁺CD28⁺ no grupo que recebeu as células do baço com as da medula óssea se aproximou do valor do grupo normal nas primeiras 72 horas (17,8±5,8 no dia 1 e 11,9±0,9 no dia 3), apresentou um aumento significativo no dia 7 (25,0±4,3) ($P<0,05$), que se manteve no dia 14 (25,9±5,9) e diminuiu no 21^o dia (8,6±1,0), em relação aos pontos anteriores ($P<0,05$) e quando comparado ao grupo inoculado com as células do baço ($P<0,01$). Não houve aumento da expressão da molécula de CD28 em nenhum dos pontos analisados.

A população T CD8⁺CD28⁺ (Figura 14B) no grupo dos animais que receberam as células do baço não apresentou muita variação quanto ao seu número (em milhões) em todo período observado (6,5±0,7 no dia 1; 5,6±1,9 no dia 3; 8,2±1,5 no dia 7; 7,9±1,3 no 14^o dia e 7,6±3,2 no 21^o dia), e se manteve próximo ao valor do grupo controle (5,2±1,1). No grupo que recebeu a população mista de células (baço+medula óssea), o valor também se aproximou ao dos camundongos *naïve* nas primeiras 72 horas (5,0±1,3 no dia 1 e 5,6±1,4 no dia 3); aumentou significativamente no 7^o dia (11,3±1,8) ($P<0,05$) e manteve esse valor até o 14^o dia (11,6±3,3). No dia 21, a

quantidade de células diminuiu em relação ao ponto anterior ($3,0 \pm 1,2$) ($P < 0,01$) e apresentou uma tendência em diminuir quando comparada ao grupo inoculado com as células do baço, nesse mesmo dia. Não houve aumento da expressão da molécula de CD28 em nenhum dos pontos da cinética.

Os resultados mostraram que as células T CD4+ e T CD8+ apresentaram um padrão de expressão do CD28 muito similar entre elas, quando analisadas no mesmo grupo. Os animais inoculados com células do baço junto com as da medula óssea mostraram aumento e queda acentuados de ambas populações, nos dias 7 e 21, respectivamente, em relação ao grupo que recebeu somente células do baço.

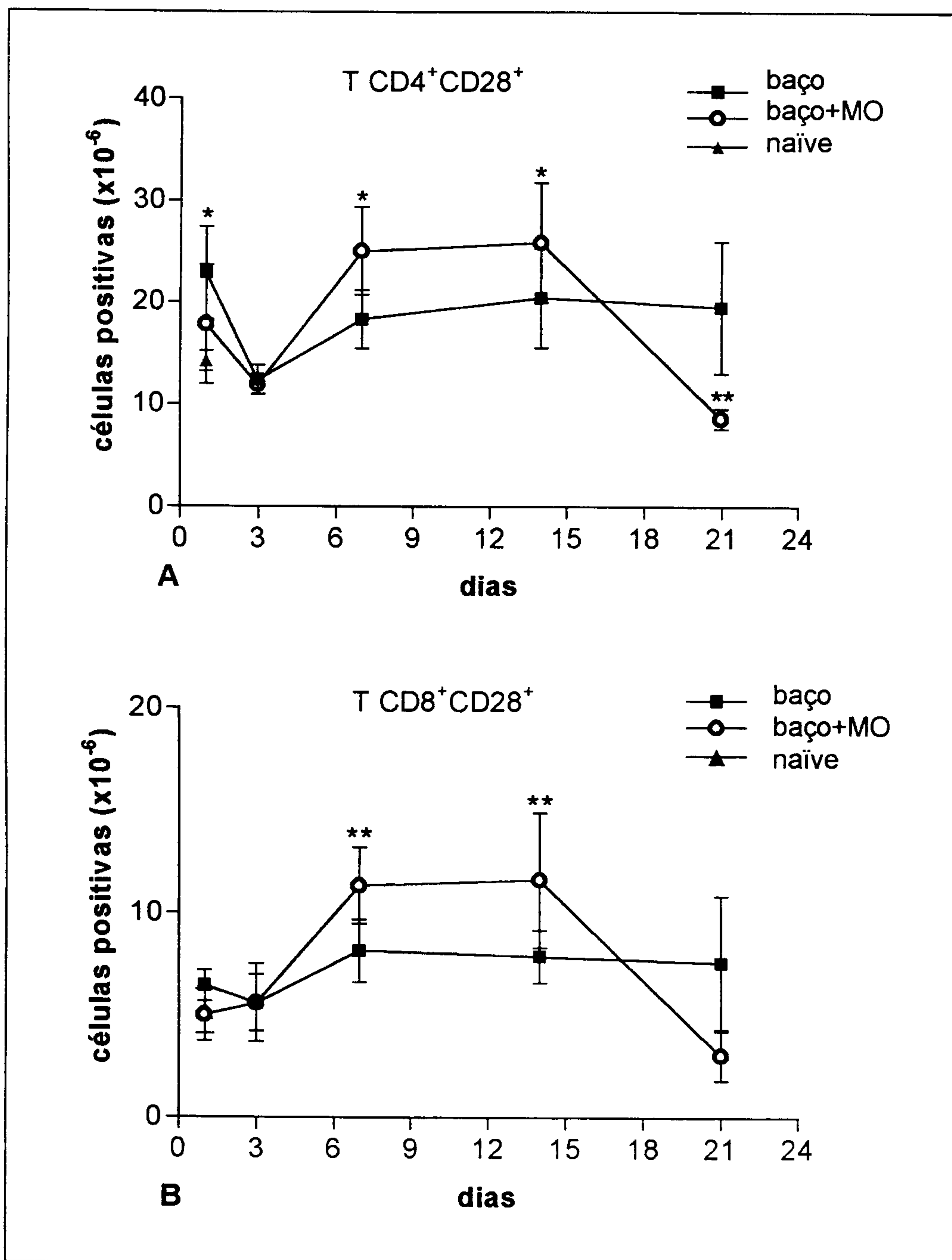


Figura 14. Número de células T CD4⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28⁺ no baço de camundongos BALB/c após a administração de células semi-alogênicas do baço ou destas junto com as da medula em diferentes períodos. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. Em diferentes tempos após a infusão, as células do baço dos receptores (n=3/ponto; naïve: n=7) foram analisadas quanto ao número de células T CD4⁺ CD28⁺ (A) e T CD8⁺CD28⁺ (B). Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão do número total de células positivas. * $P < 0,05$ em relação aos animais naïve ou ** $P < 0,01$ em relação ao grupo "B" (em A); ** $P < 0,01$ em relação aos camundongos naïve (em B).

4.4.2.4. Avaliação da população de células T CD4⁺CD40L⁺ e T CD8⁺CD40L⁺

A cinética da expressão da molécula CD40L (CD154) nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi investigada. Os resultados mostraram (em milhões de células) que a população TCD4⁺ (Figura 15A) apresentou um padrão de expressão do CD40L muito similar em ambos os grupos, sendo que o grupo dos animais que receberam as células do baço com as da medula óssea mostrou uma tendência a apresentar maior número de células TCD4⁺CD40L⁺ em relação ao grupo que recebeu as células esplênicas, entre os 7^o e 14^o dias. Nos primeiros pontos da cinética, a quantidade de células positivas no grupo que recebeu as células de baço (3,6±1,7 no dia 1 e 2,4±0,4 no dia 3) e no grupo inoculado com células do baço com as da medula óssea (2,3±1,0 no 1^o e 3,0±0,8 no 3^o dia) foi muito próxima ao do controle (3,4±0,9). No 7^o dia, o número de células do grupo que recebeu a suspensão mista aumentou significativamente (7,3±0,9) ($P < 0,01$) em relação ao ponto anterior enquanto que no dia 14 a quantidade de células apresentou uma tendência em diminuir (4,6±0,8) e se estabilizou nesse valor até o 21^o dia (4,3±1,0).

O comportamento das células TCD4⁺CD40L⁺ no grupo inoculado com as células do baço não apresentou oscilações significativas quanto ao seu número, embora tenha mostrado um aumento não significante no 7^o dia (5,3±1,1), atingindo o valor de 4,3±1,0 milhões de células no 21^o dia.

Em relação à cinética da expressão do CD40L nas células T CD8⁺, os dados (Figura 15B) mostram que o número de células positivas (em milhões) no grupo inoculado com as células esplênicas apresentou um comportamento descendente no período entre 24 horas e 7 dias (3,8±1,4 ; 2,3±0,8 e 1,5±0,2 ($P < 0,01$ em relação ao primeiro ponto)) sendo que aos 21 dias, a quantidade foi muito similar à inicial

(3,6±0,8). O número de células T CD8⁺CD40L⁺ no grupo dos animais que receberam células do baço com as da medula óssea, foi ligeiramente menor em relação ao grupo inoculado com as células do baço nas primeiras 24 horas (2,7±1,1); apresentou uma ligeira diminuição no dia 3 (1,8±0,6) e manteve um valor similar ao anterior no 7^o dia (2,16±0,4). No dia 21, o número de células positivas aumentou ligeiramente, se aproximando ao valor do grupo que recebeu células esplênicas, nesse mesmo dia (3,2±0,9). Não houve aumento da expressão da molécula CD40L nas células positivas para este receptor em nenhum ponto da cinética.

Esses resultados mostraram que o pico de expressão das células CD4⁺CD40L⁺, em ambos os grupos, ocorreu no 7^o dia, embora somente os animais que receberam células do baço com as da medula óssea tenham apresentado um aumento bastante significativo em relação aos camundongos *naïve* ($P<0,01$). Ao contrário, a população T CD8⁺CD40L⁺ no grupo administrado com as células do baço apresentou, no 7^o dia, uma diminuição significativa do número de células em relação às primeiras 24 horas ($P<0,01$).

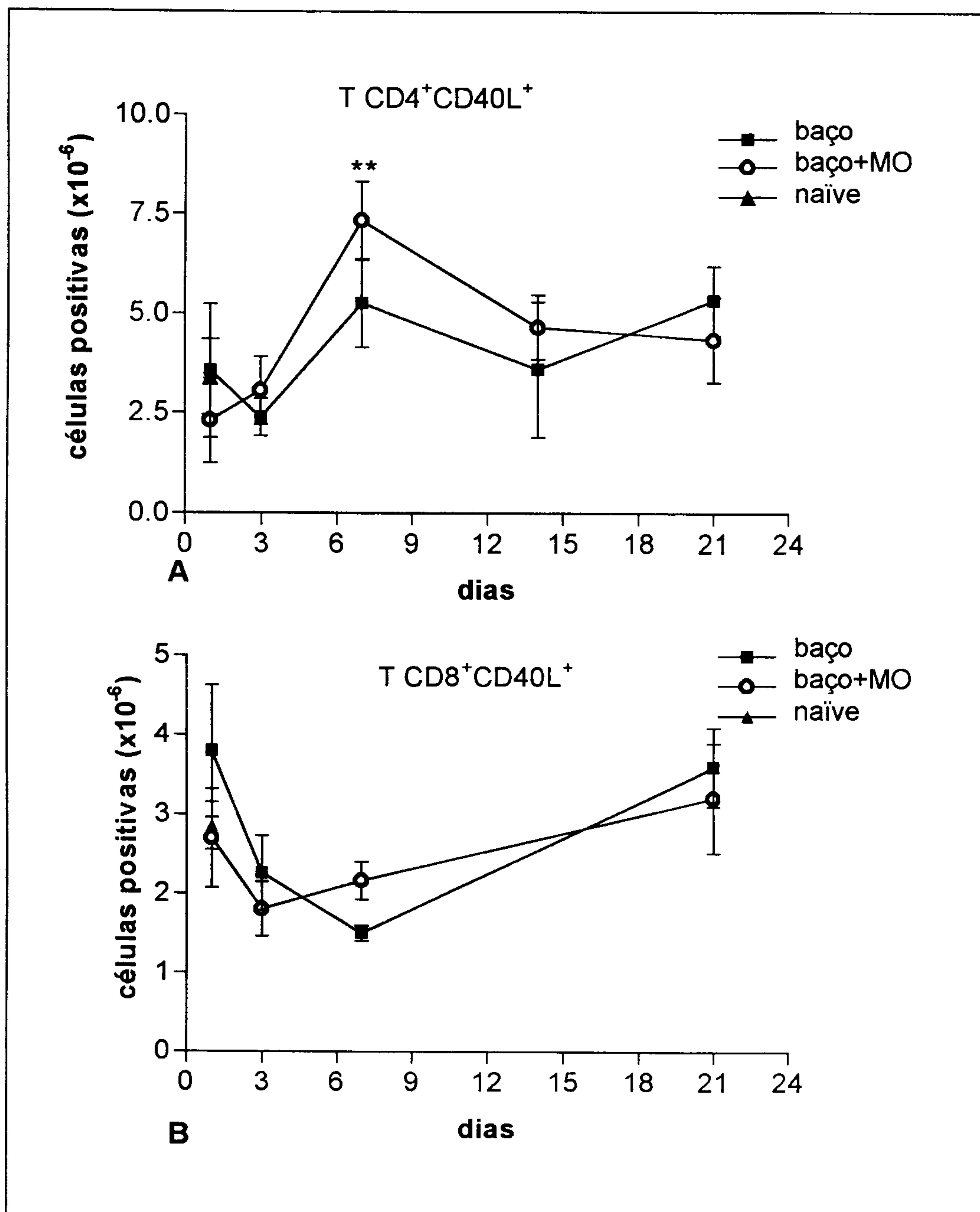


Figura 15. Número de células T CD4⁺CD40L⁺ e T CD8⁺CD40L⁺ no baço de camundongos BALB/c após a administração de células semi-alogênicas do baço ou destas junto com as da medula em diferentes períodos. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. Em diferentes tempos após a infusão, as células do baço dos receptores (n=3/ponto; *naïve*: n=5) foram analisadas quanto ao número de células T CD4⁺ CD40L⁺ (A) e T CD8⁺CD40L⁺ (B). Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão do número total de células positivas. ** $P < 0,01$ em relação aos camundongos *naïve* (em A).

4.4.2.5. Avaliação da população B220⁺

A população de células B220⁺ foi avaliada nos 14^o e 21^o dias após a infusão das células semi-alogênicas. Os dados da Figura 16 mostram uma expansão diferencial das células B entre os grupos inoculados com as células do doador nos dois pontos avaliados. No 14^o dia, camundongos que receberam células de baço apresentaram (em milhões) $39,6 \pm 5,7$ células B220⁺ positivas enquanto que no grupo que recebeu a mistura de células de baço com as da medula óssea, o número de células positivas estava ligeiramente aumentado ($57,3 \pm 10,7$) em relação ao grupo administrado com células esplênicas nesse mesmo dia, e em relação aos animais naïve ($40,2 \pm 3,9$). No dia 21, as células B220⁺ aumentaram em número no grupo que recebeu as células do baço ($59,5 \pm 7,6$; $P < 0,05$ em relação ao controle), e diminuíram nos animais administrados com a suspensão mista de células ($43,4 \pm 1,6$).

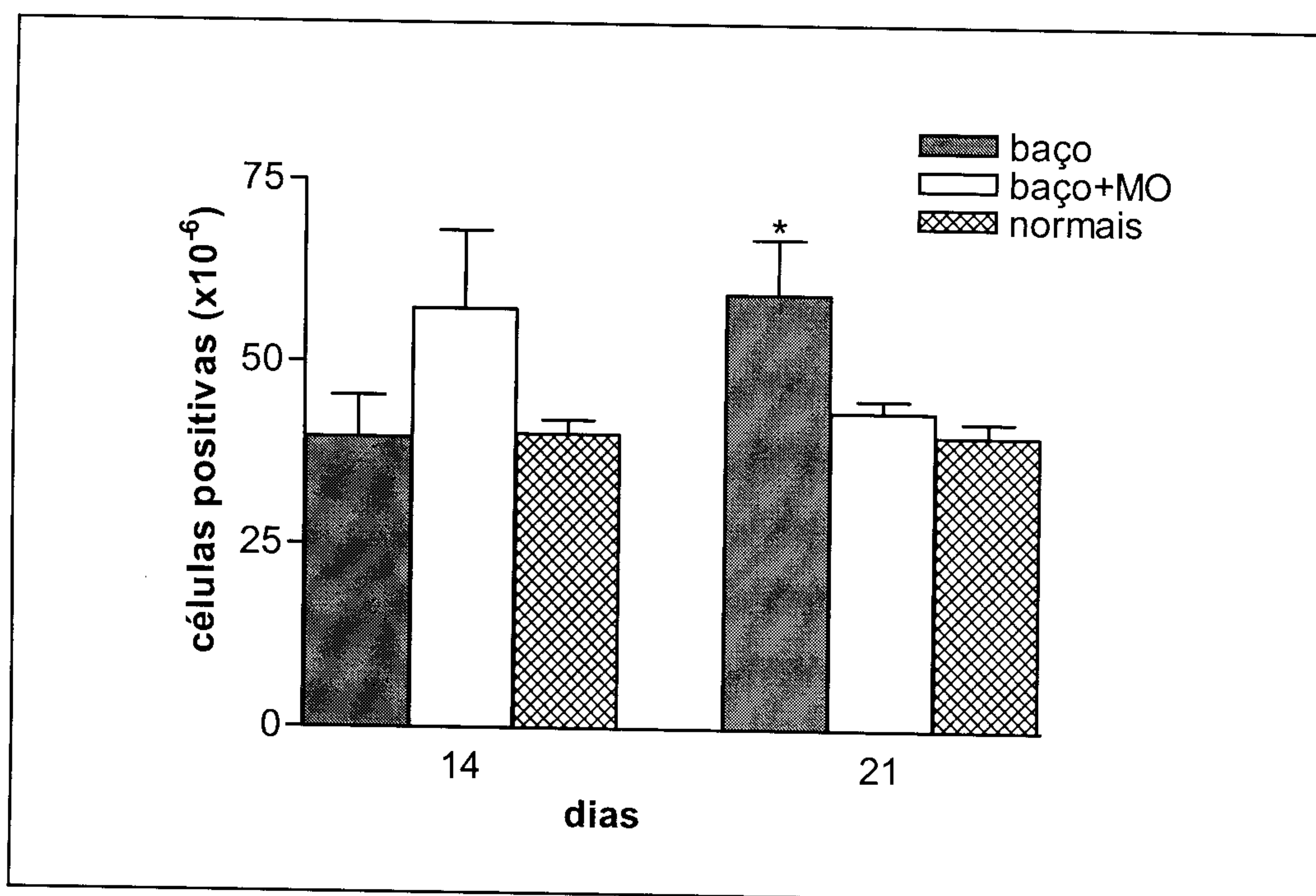


Figura 16. Número de células B220⁺ no baço de camundongos BALB/c após a administração de células semi-alogênicas do baço ou destas junto com as da medula em diferentes períodos. Cinco milhões de células do baço ou destas junto com as da medula óssea do doador na proporção 3:2 foram infundidas e.v. em camundongos BALB/c. Quatorze e 21 dias após a infusão, as células do baço dos receptores (n=3/ponto; *naïve*: n=5) foram analisadas quanto ao número de células B220⁺. Cada ponto representa a média \pm o desvio padrão do número total de células positivas. * $P < 0,05$ em relação aos camundongos *naïve*.

4.4.3. Avaliação da resposta proliferativa das células de baço de camundongos normais frente às células semi-alogênicas da medula óssea.

Uma das hipóteses que poderia explicar a rejeição diferencial do enxerto entre os grupos transplantados após a infusão das células de baço ou destas junto com as de medula óssea seria a deficiente apresentação de antígeno pelas células da medula. Outro fator que poderia contribuir com esse fenômeno seria o padrão de citocinas anti-inflamatórias produzidas pelas células da medula óssea. Para se avaliar essas hipóteses, células do baço de camundongos BALB/c normais foram co-cultivadas com células irradiadas do baço ou da medula óssea ou ainda com a combinação de células esplênicas com as da medula óssea (proporção 3:2, respectivamente), todas provenientes de camundongos (BALB/c x C57Bl/6) F_1 . A cultura foi realizada em placa de 96 poços fundo redondo ($2,5 \times 10^5$: $2,5 \times 10^5$ irradiadas) ou em placa de 24 poços (3×10^6 : 3×10^6 irradiadas) para análise da produção da IL-2, IL-10 e IFN- γ no sobrenadante.

Os resultados (Figura 17A) mostraram que as células dos camundongos BALB/c apresentaram maior resposta proliferativa frente ao baço semi-alogênico ($4613,0 \pm 1009,5$ cpm; $P < 0,001$) em relação aos ensaios onde a estimulação foi feita pelas células da medula óssea ($1035,0 \pm 699,4$ cpm) ou da mistura dessas com as de baço ($1657,2 \pm 833,3$ cpm).

A análise da produção da IL-10 (Figura 17B) mostrou se aumentada nos sobrenadantes provenientes das culturas estimuladas com células da medula óssea ($77,2 \pm 22,4$ pg/ml) e nas co-culturas com células do baço+medula óssea ($70,0 \pm 41,8$ pg/ml) quando comparados aos ensaios estimulados com células esplênicas somente ($27,5 \pm 7,3$ pg/ml; $P < 0,001$).

Esses resultados sugerem que o estímulo proveniente de células da medula óssea são capazes de induzir a diferenciação de células Th2 responsivas ao aloantígeno.

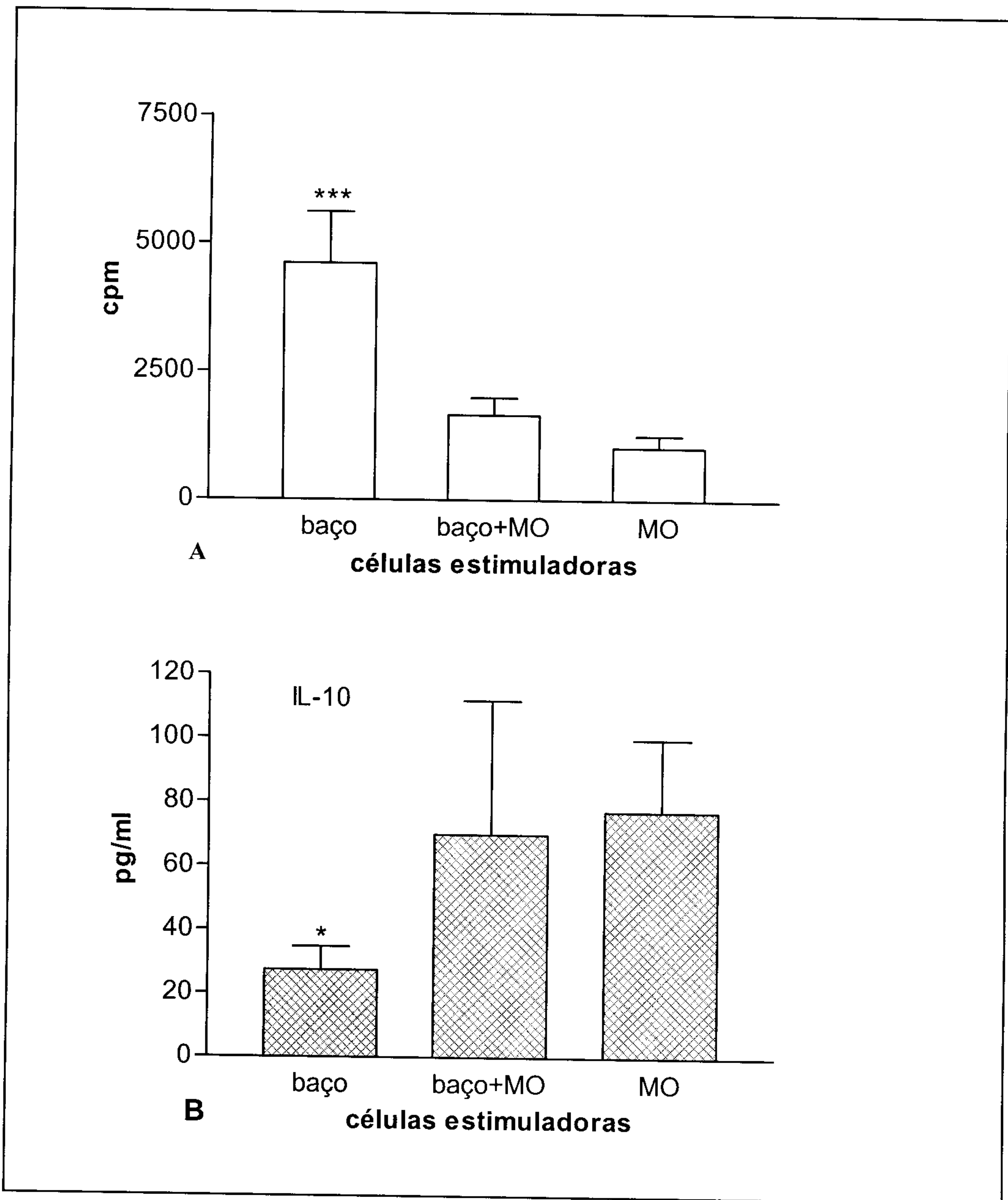


Figura 17. Resposta proliferativa das células de baço de camundongos BALB/c *naïve* frente à estimulação de células do baço, da medula óssea junto com as do baço ou somente da medula óssea provenientes de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1. Células ($2,5 \times 10^5$) do baço de camundongos *naïve* ($n=3/\text{grupo}$) foram cultivadas com células irradiadas de camundongos (BALB/c x C57Bl/6)F1 na proporção 1:1 em placa de 96 poços fundo U por 5 dias (A) ou em placa de 24 poços ($3,0 \times 10^6$; proporção 1:1) por 96 horas para avaliação da produção da IL-10 no sobrenadante (B). Cada coluna representa a média \pm desvio padrão; * $P<0,05$ ou *** $P<0,001$ em relação aos demais grupos.

5. DISCUSSÃO

O transplante de órgão garante aumento do tempo de sobrevivência do paciente e melhor qualidade de vida. O desenvolvimento de um estado de tolerância ao enxerto poderá ser alcançado através da exploração de mecanismos que normalmente mantêm a homeostase do organismo e a tolerância ao próprio.

A geração de um estado de quimerismo, através da administração de células hematopoiéticas do doador, tem sido uma das formas de indução de tolerância ao enxerto. Esse modelo baseia-se na observação de que células do doador persistem nos tecidos de pacientes tolerantes ao enxerto vários anos após o transplante (STARZL et al, 1992; SRIWATANAWONGSA et al, 1993; SCHLITT et al, 1993; COLLINS et al, 1993); essa constatação sugere que o quimerismo possa exercer função relevante no desenvolvimento e manutenção de um estado de anergia aos antígenos alogênicos.

No presente trabalho, experimentalmente conduzido em modelo murino, procurou-se, inicialmente, induzir um estado de tolerância ao enxerto semi-alogênico através da administração da mistura de células da medula óssea do doador (BALB/c x C57Bl/6)F₁ com as de baço 21 dias antes do transplante, no parental receptor BALB/c. A avaliação do fenômeno foi realizada em modelo de transplantes de pele e cardíaco.

A escolha da combinação doador-receptor com MHC semi-histocompatível ((BALB/c x C57Bl/6)F₁ – BALB/c) justificou-se pela esperada atenuação do processo de rejeição, uma vez que foi escolhido o enxerto de pele, modelo sabidamente mais imunogênico dentre outros órgãos como rim, coração e fígado. Seguindo esse princípio, SHENG-TANNER & MILLER (1992) demonstraram um aumento de sobrevivência, por

mais de 40 dias, da pele de doador semi-alogênico enxertada em recipiente não tratado com imunossupressor.

Contudo, os primeiros transplantes de pele realizados no laboratório utilizando-se o doador C57Bl/6 totalmente alogênico em receptores BALB/c, mostraram que a rejeição do enxerto ocorria no mesmo período que a rejeição da pele semi-alogênica. Mesmo assim, optou-se pela continuidade desse modelo. Investigou-se inicialmente a cinética da migração das células do doador, através da citometria de fluxo, nas primeiras 72 horas após sua administração, como expresso na Figura 10. Os resultados mostraram que as células migraram preferencialmente para o baço, sendo também detectadas na medula óssea e nos linfonodos, mas ausentes no timo. A cinética da re-circulação dessas células nesse período revelou que essas tendem a diminuir em quantidade com o passar do tempo, não sendo mais detectadas por volta do sétimo dia (dados não apresentados). Por outro lado, em receptores não transplantados, numa fase mais tardia, isto é, a partir do 35º dia após administração, as células foram detectadas pela PCR na medula óssea, no baço e no timo (Figura 11); nesse último foi possível detectá-las pelo menos até o 56º dia. Devido à sensibilidade diferencial das duas metodologias empregadas, não há como afirmar que as células não estavam mais presentes após o sétimo dia, ou como o timo não tenha sido órgão-alvo da migração desde as primeiras horas após a sua inoculação.

Uma hipótese que poderia explicar o fenômeno observado seria a da re-circulação celular. Dessa forma, as células teriam migrado para fora dos órgãos e nesses retornados e se estabelecido, entre os 42º ou 56º dia. Uma outra explicação seria de que na fase tardia, somente através de técnicas mais sensíveis, como a PCR, detectar-se-iam baixos níveis de microquimerismo.

Outra constatação importante foi a ausência de correlação entre microquimerismo e tolerância ao enxerto cardíaco. Além das evidências em transplantados humanos, vários estudos em animais tolerantes ao enxerto revelaram a presença das células do doador (ARMSTRONG et al., 1987; DEMETRIS et al., 1992; LU et al., 1994). KO e cols. (1999) mostraram, em modelo de tolerância ao transplante cardíaco induzida por ciclosporina, que a depleção dos leucócitos presentes no enxerto no mesmo dia em que foi realizado o transplante levou à rejeição severa do órgão. A prevenção da rejeição crônica do enxerto cardíaco foi demonstrada através de regimes que favoreceram o desenvolvimento de microquimerismo estável no baço, nos linfonodos abdominais, na medula óssea e no timo (SHIRASUGI et al., 2002). NORIS e cols. (2001) correlacionaram o microquimerismo no timo com tempo prolongado de aceitação do transplante renal, e observaram a ausência das células do doador nesse órgão nos animais que rejeitaram o enxerto. OTA et al. (1999) mostraram que o desaparecimento de microquimerismo no timo de ratos transplantados ocorreu alguns dias antes da total parada de batimentos do coração alogênico.

Ao contrário dessas observações, a persistência das células do doador no timo dos animais transplantados não foi condição para o estabelecimento de um estado de tolerância, nesse estudo. Apesar das evidências que associam a sobrevivência do enxerto com o microquimerismo, as presentes observações estão de acordo com as de SCHLITT et al., (1994) que documentaram a ocorrência da rejeição na presença de um microquimerismo estável. Outros autores mostraram a possibilidade de se adquirir um estado de tolerância sem o estabelecimento do microquimerismo (HISANAGA et al., 1996; ISHIDA et al., 1996). Portanto, os resultados aqui apresentados mostram que mesmo na presença das células do doador, os transplantados cardíacos não foram capazes de aceitar o enxerto, apesar do aumento do tempo de sobrevivência do mesmo. Em conjunto

com as da literatura, as observações sugerem que o microquimerismo pode favorecer mas não ser um evento indispensável ao processo de aceitação do enxerto dependendo do ambiente do receptor, e o tipo de combinação histo-incompatível que se estabeleça.

Outro fato relevante observado relacionou-se ao tempo de sobrevivência do enxerto de pele ou cardíaco, resultados expostos nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Assim, quando os camundongos receberam células do doador, muito embora a tolerância ao transplante não tenha sido estabelecida através do protocolo de administração da população mista de células do baço + medula óssea, observou-se um aumento da sobrevivência, em relação ao controle, tanto do enxerto de pele e como de transplante cardíaco. As observações feitas por MENGELE, J.O. (comunicação pessoal) sugerem que receptores BALB/c são sensibilizados após a administração de células do baço do doador (BALB/c x C57Bl/6) F_1 apresentando, portanto, rejeição acelerada da pele enxertada. A partir dessa informação, foram investigados os mecanismos passíveis de envolvimento na rejeição diferencial observada entre animais que receberam células esplênicas ou a combinação dessas com as da medula óssea, tanto na fase pós-transplante, como no intervalo entre a administração das células do doador e os enxertos.

Para tal, os parâmetros imunológicos investigados no período pós-transplante foram: a expansão de subpopulações celulares T e B; a resposta aos antígenos semi-alogênicos em ensaio de proliferação celular; e a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de células de baço do receptor estimuladas com células esplênicas irradiadas do doador. Avaliou-se, também, o envolvimento das moléculas co-estimulatórias CD28 e CD154.

O aumento expressivo da população de células B220⁺ (Figura 6C) no grupo inoculado com as células semi-alogênicas de baço, em relação aos de animais normais e

demais grupos, refletiu-se no aumento de células esplênicas totais, também acrescidas nesse grupo (Figura 6A). Esse fenômeno sugere o envolvimento de anticorpos contra os antígenos do doador. Alguns estudos sugerem que a rejeição acelerada de alo-enxertos em receptores previamente sensibilizados para os mesmos alo-antígenos envolve a participação de populações de linfócitos B, além das células T nesse processo (HANCOCK et al, 1993; HANCOCK et al, 2002).

A Figura 6B mostra a expansão da população de linfócitos T CD4⁺ em todos os grupos de animais transplantados. Vários trabalhos têm documentado a participação das células CD4⁺ na rejeição ao alo-enxerto através do bloqueio dessa molécula (SIEGLING et al., 1994; STUMBLES & MASON, 1995; SAITOVITCH et al., 1996; LEHMANN et al., 1997). Esses trabalhos em modelos animais mostraram que os tratamentos com o anticorpo monoclonal não depletante anti-CD4, YTS177, resultaram na tolerância aos enxertos, muito provavelmente pela supressão das respostas das células Th1 (SIEGLING et al., 1994; LEHMAN et al., 1997).

Os níveis de citocinas do tipo Th1, IL-2 e IFN- γ , têm sido correlacionados com a rejeição aguda de enxertos em modelos experimentais e em humanos (CUNNINGHAM et al. 1995; PICCOTTI et al., 1996; CHAN et al., 1995; DALLMAN et al., 1991; DALLMAN et al., 1993; NICKERSON et al., 1997). O IFN- γ tem sido proposto como mediador crucial nesse processo, por induzir o aumento da expressão de moléculas de MHC classe II nas células apresentadoras de antígenos, além de ativar linfócitos T citotóxicos, células NK e macrófagos em estudos *in vitro* (BILLIAU, 1996). STINN et al. (1998) demonstraram um aumento de células CD4⁺ e CD8⁺, produtoras de IFN- γ , infiltrantes no alo-enxerto cardíaco na medida em que a rejeição progredia. A IL-2, apesar de contribuir para a

rejeição aguda, parece não ser tão crítica nesse processo, segundo os estudos com camundongos $IL-2^{-/-}$ capazes de rejeitar ilhotas pancreáticas (STEIGER et al., 1995) ou o coração alogênico (DAÍ et al., 1998). No presente estudo observou-se um aumento significativo da produção de $IFN-\gamma$ nos grupos que foram transplantados com a pele semi-alogênica, em relação aos animais normais (Figura 9B). Considerando-se que esses receptores já haviam rejeitado o enxerto, como no caso do grupo que recebeu as células do baço do doador e do controle, ou estariam preparando-se para tal processo, caso do grupo inoculado com as células de baço + medula óssea, o aumento da secreção dessa citocina foi um fenômeno esperado e está em conformidade com dados da literatura.

A expectativa em torno de uma produção elevada de $IFN-\gamma$ no grupo que recebeu células esplênicas, em relação aos demais, fato não observado, se justificaria pelos seguintes aspectos: 1- A rejeição acelerada do enxerto e 2- A resposta proliferativa diminuída quando comparada à proliferação das células provenientes do grupo inoculado com células do baço + medula óssea (Figura 8). Nesse caso, essa diferença poderia ser interpretada como um aumento da capacidade efetora das células do grupo previamente sensibilizado com células do baço do doador, as quais apresentariam menor potencial proliferativo, relativamente ao grupo de animais que receberam células do baço com as da medula óssea que, por sua vez, disponibilizaria um maior número de células *naïve* por não terem sido sensibilizadas como no grupo anterior. Esse entendimento é reforçado pelo fato de haver retardo no processo de rejeição. No entanto, a produção da $IL-2$ não refletiu esse fenômeno, sendo que o grupo que obteve maior proliferação não foi o que expressou níveis maiores de secreções dessa interleucina. Como essas citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura mista, é muito provável que suas produções tenham ocorrido

por células T de memória, o que, a princípio, poderia explicar seu perfil de secreção, típicos do primeiro encontro com o antígeno, similares aos índices determinados nas secreções pelas células dos camundongos normais.

Assim como as células Th1 estão associadas com a rejeição de alo-enxertos, as citocinas expressas pela subpopulação Th2, como IL-4 e IL-10, podem modular a rejeição aguda e estarem implicadas no desenvolvimento da tolerância dos mesmos (TAKEUCHI et al., 1992; SAYEGH et al., 1995; PAUL, 1994; CHEN & FIELD, 1995; NICKERSON et al., 1994). Estudos em ratos mostraram que a tolerância ao coração alogênico, estava associada ao aumento da produção da IL-4 (PAPP et al., 1992), bem como à expressão elevada de IL-10; já a produção de IL-2 e de IFN- γ estavam reduzidos (MOTTRAM et al., 1995). SAGGI et al. (1999) demonstraram um aumento da expressão de IL-4 e IL-10 no enxerto renal, constatando-se histologia normal, de animais imunossuprimidos. No entanto, nem sempre parece ser regra a associação entre rejeição ou tolerância com o padrão de produção de citocinas das células Th1 ou Th2, respectivamente. Resultados com camundongos deficientes quanto à produção de citocinas dessa natureza, ou transgênicos para as mesmas, não apoiam esse paradigma. Assim, animais IL-2^{-/-} ou IFN- γ ^{-/-} não foram capazes de aceitar o enxerto por longo tempo, bem como a expressão elevada de IL-4 nas ilhotas pancreáticas alogênicas não induziram tolerância às mesmas (revisado em LAKKIS, 1998). KRIEGER e cols. (1996) documentaram a coexistência da expressão das citocinas Th1, IL-2 e IFN- γ , e Th2, IL-4 e IL-10, em animais tolerantes ao enxerto cardíaco induzido pelo anticorpo anti-CD2.

No presente estudo, a produção da IL-4 no sobrenadante das culturas foi inexpressiva, não havendo diferenças entre os grupos. Em relação à IL-10, o grupo

tratado antes do transplante com as células do baço + medula óssea apresentou um aumento na produção dessa citocina quando comparado aos demais, como revela a Figura 9C. Esses resultados sugerem que o retardo na rejeição da pele, por esse grupo, está relacionado a um aumento do padrão Th2, uma vez que a produção do IFN- γ encontra-se aumentada nesses animais, assim como nos demais transplantados. O acréscimo da secreção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c normais cultivadas simultaneamente com semi-alogênicas da medula óssea, ou dessas com as de baço, reforça a idéia de que as células da medula óssea podem induzir a produção dessa citocina e que esse padrão não é revertido pela estimulação das células do baço dos híbridos F₁.

O envolvimento das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40L na rejeição diferencial do enxerto, seja através da expansão dessas subpopulações, ou do aumento da expressão das mesmas, foi investigado. O processo de ativação celular tem sido descrito como um fenômeno que envolve a sinalização para o TCR, via complexo MHC-peptídeo pelas células apresentadoras de antígenos, e a interação das moléculas CD28 – receptores constitutivos presentes nas células T primárias – com os ligantes B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) presentes nas APCs. A interação entre as moléculas CD40, expressas nas APCs, e o CD40L, também é aceita como participativa no processo de ativação das células T e na cooperação entre T e B (GREWAL & FLAVELL, 1998). Diferentemente do CD28, o CD40L é expresso predominantemente nas células T CD4⁺ ativadas e em algumas células T CD8⁺ (ZHAI et al., 2002). Vários estudos têm mostrado que a utilização de anticorpos ou proteínas de fusão que bloqueiam a interação B7/CD28 e CD40/CD40L, com ou sem a administração das células do doador, têm sido eficientes no aumento do

tempo de sobrevida do aloenxerto (LARSEN et al., 1996; SAYEGH et al., 1997; JUDGE et al., 1999; MARKEES et al., 1998; KIRIK et al., 1996). DURHAM et al. (2000) induziram tolerância ao enxerto de pele e proporcionaram o desenvolvimento de microquimerismo estável através de infusões repetidas de células alogênicas da medula óssea, acompanhadas da administração do anticorpo anti-CD40L na ausência de imunossupressão. Outros autores demonstraram a eficiência do regime de bloqueio da co-estimulação juntamente com administração de células do doador sob uma dose mínima de droga imunossupressora (SHIRASUGI et al., 2002). Apesar das evidências, os mecanismos relacionados ao efeito imunomodulatório desse regime ainda não são compreendidos, assim como as efetividades desse tratamento quanto à estabilidade e o tempo de duração do estado de tolerância, que ainda não são claros.

Os resultados do presente estudo mostraram um aumento do número de células T $CD8^+CD28^+$ no 7º dia após o transplante (Figura 7A), no grupo de camundongos que recebeu células semi-alogênicas do baço, em relação aos animais normais. Embora a diferença não tenha sido significativa, esse grupo mostrou tendência ao aumento do número dessas células quando comparado aos demais transplantados. Esses resultados indicam o envolvimento dessa subpopulação no processo da rejeição, e aponta para a possibilidade de que o CD28 possa participar da rejeição acelerada do enxerto. Apesar de ocorrer expansão da população T $CD4^+$ no grupo de animais que receberam células do baço do doador (Figura 6B), não foi observado aumento do número de células T $CD4^+CD28^+$ em nenhum dos grupos transplantados, comparativamente aos camundongos normais, como mostra a Figura 7A.

Os estudos de MAIER et al. (2001) evidenciam que camundongos deficientes na expressão da molécula CD28, $CD28^{-/-}$, são capazes de aceitar o coração semi-alogênico

de híbridos F_1 sem a necessidade de qualquer tipo de tratamento. Aqui, utilizando-se o mesmo modelo animal, procurou-se verificar a tolerância ao enxerto da pele semi-alogênica em recipientes previamente tratados, ou não, com as células do doador. Todos os camundongos $CD28^{-/-}$ ($n=7$) rejeitaram pele dos (BALB/c x C57Bl/6) F_1 transplantada 96 horas após a infusão endovenosa de 5 milhões de células da medula óssea com as de baço na relação de 2:3 (dados não apresentados). Os animais que não foram tratados com as células ($n=3$), também rejeitaram o enxerto junto com o controle selvagem ($CD28^{+/+}$). Esses resultados, analisados conjuntamente com os de MAIER e cols., sugerem fortemente que, nesse modelo, a natureza do enxerto pode implicar ou não o envolvimento do CD28 na rejeição. Por outro lado, o aumento da população de células T $CD8^+CD28^+$ no grupo sensibilizado com as células semi-alogênicas do baço e que rejeitaram a pele (Figura 7A), leva à hipótese de que o comprometimento dessa molécula na rejeição talvez seja eficiente se atuarem em conjunto com outras. Apesar das inferências, a análise de ambos os experimentos deve ser feita considerando-se que os recipientes são de linhagens diferentes, muito embora as disparidades das moléculas de MHC sejam equivalentes ((BALB/c x C57Bl/6) F_1 → BALB/c ou BALB/c x C57Bl/6) F_1 → C57Bl/6). Portanto, a conclusão mais plausível seria a de que o envolvimento da molécula co-estimuladora CD28 na rejeição ao alo-enxerto pode ser dependente da natureza do mesmo e da constituição genética do receptor. Esta hipótese vai de acordo com os estudos de WILLIAMS et al. (2000) que demonstraram uma habilidade diferencial na resposta aos aloantígenos, independentemente do bloqueio das moléculas CD28/CD40 e dependente da constituição genética do receptor.

A avaliação das subpopulações T CD4⁺CD40L⁺ e T CD8⁺CD40L⁺ mostrou que essas células estavam aumentadas em todos os grupos transplantados quando comparados aos animais normais (Figura 7B). No entanto, nenhuma diferença entre os grupos tratados com as células semi-alógenicas foi observada. ZHAI e cols. (2002) mostraram que o bloqueio do CD40L, em camundongos sensibilizados com a pele alógena, não preveniu rejeição do enxerto cardíaco proveniente do mesmo doador. Os estudos realizados por esses autores demonstraram que apenas as células T CD8⁺ alo-reativas naïve eram estimuladas pelo CD40L, e que o bloqueio dessa molécula não afetou a atividade citotóxica das células de memória. No presente estudo, o aumento do número de células T CD8⁺CD40L⁺ nos animais transplantados sugere que essa subpopulação tenha sido ativada pelo aloantígeno, como evidenciado na Figura 7B. Somada a essa, a premissa de ZHAI e cols., acima citada, reforça a idéia de que os animais do grupo transplantado após a administração das células de baço não expressariam uma população aumentada de células T CD8⁺CD40L⁺ pelo fato de terem sido sensibilizados e, portanto, apresentariam um compartimento de células de memória. Por outro lado, ao se considerar que a mistura de células de baço com as da medula óssea não teria sido suficiente para sensibilizar o recipiente, a expectativa seria de que a população T CD8⁺CD40L⁺ estaria aumentada em relação ao grupo anterior. Outra hipótese que poderia ser levantada seria a de que a estabilidade do número de células positivas, nesse mesmo grupo, se devesse à menor interação entre as moléculas CD40-CD40L por uma apresentação diminuída de antígenos, ou ainda, insuficiente ativação de células apresentadoras, conforme sugerem os experimentos com camundongos normais frente ao estímulo das células da medula óssea, dados presentes na Figura 17A.

Quanto ao compartimento T CD4⁺, os dados sugerem que essa população também utiliza-se do CD40L na ativação durante o reconhecimento do aloantígeno (Figura 7B). Esse fenômeno mostra que os aloantígenos estão sendo apresentados pelas APCs do próprio receptor, conhecida como via de apresentação indireta de antígenos. A magnitude da contribuição dessa via para o processo de rejeição parece depender da natureza do tecido do doador, sendo a pele apontada como mais imunogênica quando comparada ao coração, por exemplo (AUCHINCLOSS et al., 1993; CAMPOS et al., 1995). Na rejeição crônica, o reprocessamento dos antígenos do doador pelas APCs do receptor tem sido sugerido como um dos principais iniciadores do fenômeno (VELLA et al., 1997).

Células T CD8⁺ citotóxicas também podem ser ativadas pela via de apresentação indireta, também conhecida como “apresentação cruzada” (BEVAN, 1976; MATZINGER & BEVAN, 1977; ARNOLD et al., 1995). Nesse caso, os antígenos do doador são processados pelas células apresentadoras do receptor, e apresentados com os antígenos próprios. Portanto, aumenta-se muito a possibilidade de participação efetiva dessa população de células. Esse fato somado aos resultados anteriores sugerem que o CD28 tem um envolvimento pouco expressivo e de menor magnitude quando comparado à participação da molécula CD40L.

Em outros experimentos, avaliou-se a expansão de células T CD28⁺ ou T CD40L⁺ em vários momentos no intervalo entre a administração das células do doador e o transplante. Quanto às subpopulações T CD28⁺, a administração das células de baço com as de medula óssea permitiu a expansão de ambas as populações – T CD4⁺ e T CD8⁺ – no intervalo entre o 7^o e o 14^o dias, e uma queda significativa do número dessas células em relação ao ponto anterior (Figura 14A). Saliente-se que no grupo inoculado com as células do baço, não houve expansão dessas subpopulações ao longo do período. Ao se

pensar no fenômeno da rejeição diferencial, considera-se que esse último grupo teria sido sensibilizado pelas células do doador, administradas antes do transplante. Em decorrência, a expectativa seria a de ocorrer expansão das populações T CD28⁺, considerando-se o envolvimento dessa molécula. Como a população T CD8⁺CD28⁺ estava aumentada nesse grupo durante a rejeição, fato apresentado na Figura 7A, sugere-se a participação dessa molécula somente na fase pós-transplante e não no processo de sensibilização. A diminuição acentuada do número de células positivas no 21^o dia, no grupo inoculado com as células do baço com as da medula óssea, poderia ser apontada como atenuante na rejeição, uma vez que o número de células T CD8⁺CD28⁺ retorna aos níveis muito próximos aos observados no grupo de animais normais, no 7^o dia após o enxerto. Essa hipótese pode ser válida ao considerar-se que a proliferação seja indicativo do envolvimento da mesma no processo de ativação celular, já que não observou-se aumento da expressão da molécula.

Como mostra a Figura 15, ao contrário da dinâmica da população T CD28⁺, as células CD40L positivas apresentaram comportamento diferenciado entre as subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺. A expansão da população T CD4⁺CD40L⁺ foi observada no 7^o dia, principalmente no grupo inoculado com células do baço conjuntamente às de medula óssea. Ao contrário, as células T CD8⁺CD40L⁺ apresentaram tendência à diminuição no intervalo entre os 3^o e 7^o dias, principalmente no grupo inoculado com as células do baço do doador, e um aumento no 21^o dia, em ambos os grupos. Essa expansão diferencial poderia indicar a ativação de diferentes populações de células T CD8⁺ em diferentes estágios de diferenciação.

A investigação a respeito do envolvimento das moléculas CD28 e CD40L na ativação diferencial das células T, entre os grupos inoculados com as células do doador,

no período pré-transplante, indica que não há participação dessas moléculas nesse processo. Apesar do aumento das células B220⁺ no 21^o dia, no grupo que recebeu células semi-alogênicas do baço (Figura 16), não houve correlação desse evento com a expressão do CD40L. Ainda em relação à esse compartimento, o aumento observado sugere a participação dessas células na rejeição acelerada do enxerto.

A expansão das populações das células esplênicas T CD4⁺, TCD28⁺ e T CD4⁺CD40L⁺ no 7^o dia após a administração de células do baço com as da medula óssea, pode ter relação com a presença das células do doador no baço dos receptores nesse período. No entanto, não há dados sobre o desenvolvimento do microquimerismo nos recipientes das células semi-alogênicas do baço, e portanto, não há como validar a hipótese de que a expansão seja consequência do microquimerismo, apesar deste fenômeno não ter sido observado nesse grupo. Como o microquimerismo na ausência do transplante parece ter sido estável e duradouro, tanto no baço como principalmente no timo, constatando-se as células exógenas no mínimo por 56 dias, procurou-se investigar o comportamento da rejeição do enxerto de pele em animais esplenectomizados e timectomizados antes da inoculação das células do doador, utilizando-se o mesmo protocolo. A implicação do timo no aumento do tempo de sobrevivência do transplante, após injeção das células do baço com as da medula óssea, poderia ser demonstrada caso ocorresse rejeição acelerada do enxerto em camundongos timectomizados. A migração das células da medula óssea do doador para o timo poderia induzir a morte, por apoptose, dos timócitos potencialmente alo-reativos em diferenciação, como consequência da forte interação entre o TCR do recipiente e o MHC alogênico. A suposição de que as células do doador poderiam não migrar para o timo ou não se estabilizar no organismo dos animais que receberam a injeção de células esplênicas, somente endossaria a importância da

participação do timo no processo. Por questões técnicas e/ou a inexperiência com o procedimento da timectomia, não foi possível a realização do experimento nesse grupo de animais. Nos animais esplenectomizados, 10 dias antes da administração das células, a rejeição do enxerto ocorreu no 5º dia em todos os animais inoculados com células do baço e da medula óssea (dados não mostrados). No grupo que recebeu as células do baço, a rejeição ocorreu entre o 7º e 13º dia; no grupo controle, a rejeição foi em torno do 9º dia. Esses experimentos sugerem o envolvimento do baço no processo da rejeição diferencial do enxerto, e aponta para a importância do micro-ambiente na aceleração ou na imunomodulação da resposta alo-reativa.

Portanto, a hipótese aventada e que explicaria a rejeição diferencial, baseia-se na parte do pressuposto de que as células semi-alogênicas migrariam, dentre outros órgãos, para o baço, apresentariam antígenos pelas vias direta ou indireta, e ativariam linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Independente da composição do inóculo, haveria a produção de altos níveis de IFN- γ pelos linfócitos T alo-reativos, porém, o aumento do padrão de citocinas Th2/Th1 seria observado somente no grupo inoculado com as células do baço com as da medula óssea. O aumento significativo de células B nos animais que rejeitam o enxerto de forma acelerada poderia implicar no envolvimento de resposta humoral no processo. A persistência da população de células do baço conjuntamente às da medula óssea no organismo do receptor, após a inoculação das mesmas, poderia ser importante na modulação da resposta ao enxerto, principalmente ao enxerto cardíaco, haja visto o aumento do tempo de sobrevivência do órgão (Figura 2).

6. CONCLUSÕES

1. A administração de células do baço com as da medula óssea de híbridos F₁ (BALB/c x C57Bl/6) permite o prolongamento do enxerto cardíaco e o de pele. Esse aspecto foi realçado nos recipientes BALB/c previamente inoculados com as células semi-alogênicas do baço;
2. O desenvolvimento de um microquimerismo estável, até o 35º dia após o transplante, não se correlacionou com aumento do tempo de sobrevivência do enxerto cardíaco;
3. O aumento da secreção da IL-10 pelas células dos animais transplantados após a infusão das células do baço com as da medula óssea, frente ao estímulo semi-alogênico, evidencia a participação dessa citocina no retardo da rejeição;
4. O aumento da população de células B nos animais que rejeitaram o enxerto de forma acelerada sugere a participação da resposta humoral nesse processo;
5. Não houve participação das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40L na ativação das células do recipiente após a inoculação das células semi-alogênicas. Embora essas moléculas possam estar envolvidas na rejeição ao enxerto de pele, principalmente o CD40L, não observou-se diferenças na sua expressão quando comparados os grupos que receberam as células do doador;
6. Os receptores das células semi-alogênicas do baço com as da medula óssea apresentaram microquimerismo estável até o 42º ou, no mínimo no 56º dia, na ausência

do transplante. Esses resultados sugerem que a persistência dessa população pode refletir-se na baixa geração de respostas efetoras pelas células T do receptor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A; MURPHY, KM; SHER, A. Functional Diversity of Helper T Lymphocytes. **Nature V 383**, p 787-793, 1996.

ADLER, SH; TURKA; L. Immunotherapy as a Means to Induce Transplantation Tolerance. **Curr Opin Immunol V 14**, p 600-665.

AGUS, DB; SURH, CD; SPRENT, J. Reentry of T Cells to the Adult Thymus is Restricted to Activated T Cells. **J Exp Med V 173**, p. 1039-1046, 1991.

ARMSTRONG, HE; BOLTON, EM; MCMILLAN, I; SPENCER, SC; BRADLEY, JÁ. Prolonged Survival of Actively Enhanced Rat Renal Allografts Despite Accelerated Cellular Infiltration and Rapid Induction of Both Class I and Class II MHC Antigens. **J Exp Med V 164**, p 891-907, 1987.

ARNOLD, D; FAATH, S; RAMMENSEE, H; SCHILD, H. Cross-Priming of Minor Histocompatibility Antigen-Specific Cytotoxic T Cells Upon Immunization with the Heat-Shock Protein GP96. **J Exp Med V 182**, p 885-889, 1995.

AUCHINCLOSS, H JR; LEE, R; SHEA, S; MARKOWITZ, JS; GRUSBY, MJ; GLIMCHER, LH. The Role of "Indirect" Recognition in Initiating Rejection of Skin Grafts from Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice. **Proc Natl Acad Sci USA V 90**, p 3373-3377, 1993.

BARBER, WH; MANKIN, JÁ; LASKOW, DA; DEIERHOI, MH; JULIAN, BA; CURTIS, JJ; DIETHELM, AG. Long-Term Results of a Controlled Prospective Study with Transfusion of Donor-Specific Bone Marrow in 57 Cadaveric Renal Allograft Recipients. **Transplantation V 51**, p 70-75, 1991.

BEMELMAN, F; HONEY, K; ADAMS, E; COBBOLD, S; WALDMANN, H. Bone Marrow Transplantation Induces Either Clonal Deletion or Infectious Tolerance Depending on the Dose. **J Immunol, V 160**, p 2645–2648, 1998.

- BEVAN, MJ. Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congeneic Cells which do not Cross-React in the Cytotoxic Assay. **J Exp Med** V 143, p 1283-1288, 1976.
- BILLIAU, A. Interferon-Gamma: Biology and Role in Pathogenesis. **Adv Immunol** V 62, p 61-130, 1996.
- BILLINGHAM, RF; BRENT, L; MEDAWAR, PB. Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. **Nature** V 172, p 603-606, 1953.
- CAMPOS, L; NAJI, A; DELI, BC; KERN, JH; KIM, JI; BARKER, CF; MARKMANN JF. Survival of MHC-Deficient Mouse Heterotopic Cardiac Allografts. **Transplantation** V 59, p 187-191, 1995.
- CHAN, SY; DEBRUYNE, LA; GOODMAN, RE; EICHWALD, EJ; BISHOP, DK. In Vivo Depletion of CD8+ T Cells Results in the Th2 Cytokine Production and Alternate Mechanisms of Allograft Rejection. **Transplantation** V 59, p 1155-1161, 1995.
- CHAU, LA; ROHEKAR, S; WANG, JJ; LIAN, D; CHAKRABARTI, S; ZHANG, L; ZHONG, R; MADRENAS, J. Thymic Re-Entry of Mature Activated T Cells and Increased Negative Selection in Vascularized Allografts Recipients. **Clin Exp Immunol.** V 127, p 43-52, 2002.
- CHEN, N; FIELD, EH. Enhanced Type 2 and Diminished Type 1 Cytokines in Neonatal Tolerance. **Transplantation** V 15, p 933-941, 1995.
- CHO, SI; MARCUS, FS; KOUNTZ, SI. A New Model for Study of Allograft Rejection in the Rat: Use of Skin with an Intact Vascular Pedicle. I. Effect of Vascularity on Allograft Survival. **Transplantation** V 13, p 486-492, 1972.
- COLLINS, RH; ANASTANI, J; TERSTAPPEN, LWMM; NIKAEIN, A; FENG, J; FAY, JW; KLINTMALM, G; STONE, MJ. Donor-Derived Long-Term Multilineage Hematopoiesis in a Liver Transplant. **N Eng J Med.** V328, p762-765, 1993.

- CORREA, I; RAULET, DH. Binding of Diverse peptides to MHC class I Molecules Inhibits Target Cell Lysis by Activated Natural Killer Cells. **Immunity** V 2, p 61-71, 1995.
- CORRY, RJ; WINN, HJ; RUSSELL, PS. Primarily Vascularized Allografts of Heart in Mice: the Role of H-2D, H-2K and Non H-2 Antigens in Rejection. **Transplantation** V 16, p 343, 1973.
- CUNNINGHAM, DA; DUNN, MJ; YACOUB, MH; ROSE, ML. Local Production of Cytokines in the Human Cardiac Allograft: a Sequential Study. **Transplantation** V 57, p 1333-1337, 1995.
- DAI, Z; KONIECZNY, BT; BADDOURA, FK; LAKKIS, FG. Impaired Alloantigen-Mediated T Cell Apoptosis and Failure to Induce Long Term Allograft Survival in Interleukin-2-Deficient Mice. **J Immunol** V 161, p 1659-1653, 1998.
- DALLMAN, MJ. Cytokines as Mediators of organ graft rejection and tolerance. **Curr Opin Immunol** V 5, p 788-793, 1993.
- DALLMAN, MJ; LARSEN, CP; MORRIS, PJ. Cytokine gene transcription in vascularized organ grafts. **J Exp Med** V 174, p 493-496, 1991.
- DAVIS, WC; MCKENZIE, IFC; MELWOLD, RW. A Comparison of Skin and Heart Graft Rejection Patterns in H-2 Mutant Mice. **Transplantation** V 29, p 189-192, 1980.
- DEMETRIS, AJ; MURAES, N; STARZL, TE. Donor Dendritic Cells After Liver and Heart Allograft Transplantation Under Short-Term Immunosuppression. **Lancet** V 339, p 1610-1611, 1992.
- DONAHUE, J; GILPIN, E; LEE, TH; BUSCH, MP; CROFT, M; CARRIER, E. Microchimerism does not Induce Tolerance and Sustains Immunity After In Utero Transplantation. **Transplantation**, V 71, p 359-368, 2001.
- DUQUESNOY, R; DEMETRIS, A. Immunopathology of Cardiac Transplant Rejection.

Curr Opin Cardiol V 10, p 193-206, 1995.

DURHAM, MM; BINGAMAN, AW; ADAMS, AB; HA, J; WAITZE, S-Y; PEARSON, TC; LARSEN, C. Administration of Anti-CD40L and Donor Bone Marrow Leads to hemopoietic Chimerism and Donor-Specific Tolerance Without Cytoreductive Conditioning. **J Immunol** V 164, p 1-4, 2000.

ELLISON, G; WAKSMAN, B. Role of the Thymus in Tolerance. IX. Inhibition of Experimental autoallergic Encephalomyelitis by Intrathymic Injection of Encephalitogen. **Immunology Rev.** V 105, p 322-329, 1970.

ETO, M; HACKSTEIN, H; KANEKO, K; NOMOTO, K; THOMSON, AW. Promotion of Skin Graft Tolerance Across MHC Barriers by Mobilization of Dendritic Cells in Donor Hemopoietic Cell Infusions. **J Immunol** V 169, p 2390–2396, 2002.

ETO, M; MAYUMI, H; TOMITA, Y; YOSHIKAI, Y; NISHIMURA, Y; NOMOTO, K. The Requirement of Intrathymic Mixed Chimerism and Clonal Deletion for a Long-Lasting Skin Allograft Tolerance in Cyclophosphamide-Induced Tolerance. **Eur J Immunol** V 20, p 2005-2013, 1990.

ETO, M; MAYUMI, H; TOMITA, Y; YOSHIKAI, Y; NOMOTO, K. Intrathymic Clonal Deletion of V Beta 6+ T Cells In Cyclophosphamide-Induced Tolerance to H-2-Compatible, MIs-Disparate Antigens. **J Exp Med** 171, 97-, 113, 1990a.

FUCHIMOTO, Y; GLEIT, ZL; HUANG, CA; KITAMURA, H; SCHWARZE, ML; MENARD, MT; MAWULAWDE, K; MADSEN, JC; SACHS, DH. Skin-Specific Alloantigens in miniature swine. **Transplantation** V 72, p 8-9, 2001.

GEORGE, JF; SWEENEY, SD; KIRKLIN, JK; SIMPSON, EM; GOLDSTEIN, DR; THOMAS, JM. An Essential Role for Fas Ligand in Transplantation Tolerance Induced by Donor Bone Marrow. **Nat Med** V 4, p 333-335 , 1998.

GOLDSTEIN, DR; CHANG, T; SWEENEY, SD; KIRKLIN, JK; THOMAS, JM; GEORGE,

JF. Enhanced Allograft Survival Induced by Posttransplant Donor Spleen Cells Infusion Occurs Via a Mechanism that is Distinct from the Mechanism of Enhancement by Donor Bone-Marrow. **Transplantation** V 69, p. 1020-1022, 2000.

GOLDSTEIN, DR; THOMAS, JM; KIRKLIN, JK; GEORGE, F. An Essential Role for Natural Killer Cells in Augmentation of Allograft Survival Mediated by Donor Cells. **Transplantation** V 72, p. 954-956, 2001.

GREWAL, IS; FLAVELL, RA. CD40 and CD154 in Cell-Mediated Immunity. **Annu Rev Immunol** V 16, p 111-135, 1998.

HALE, DA; GOTTSCHALK, R; MAKI, T; MONACO, AP. Use of CTLA4-Ig in Combination with Conventional Immunosuppressive Agents to Prolong Allograft Survival. **Transplantation** V 64, p 897-900, 1997.

HANCOCK, WW; GAO, W; SHEMMERI, N; SHEN, XD; GAO, F; BUSUTTIL, RW; ZHAI Y; KUPIEC-WEGLINSKI, JW. Immunopathogenesis of Accelerated Allograft Rejection in Sensitized Recipients: Humoral and Nonhumoral Mechanisms. **Transplantation** V 73, p 1392-1397, 2002.

HANCOCK, WW; SAYEGH, MH; KWOK, CA; WEINER, HL; CARPENTER, CB. Oral, but not Intravenous, Alloantigen Prevents Accelerated Allograft Rejection by Selective Intragraft Th2 Cell Activation. **Transplantation** V 55 p, 1112-1118, 1993.

HERBERT, J; ROSER, B. Strategies of Monoclonal Antibody Therapy that Induce Permanent Tolerance of Organ Transplants. **Transplantation** V 46(2 suppl), p 128S-134S, 1988.

HISANAGA, M; HUNDRIESER, J; BOKER, K; UTHOFF, K; RADATZ, G; WAHLERS, T; WONIGEIT K, PICHLMAYR, R; SCHLITT, HJ. Development, Stability, and Clinical Correlations of Allogeneic Mochimerism after Solid Organ Transplantation. **Transplantation** V 61, p 40-45, 1996.

ISHIDA, H; KAWAI, T; TANABE, K; HAYASAKA, Y; YASUO, M; TOMA, H; OTA, K.

Status of Microchimerism in Recipients 15 Years after Living Related Kidney Transplantation. **Transplantation** V 63, p 459-467, 1999.

ITOH, M; TAKAHASHI, T; SAKAGUCHI, N; KUNIYASU, Y; SHIMIZU, J; OTSUKA, F; SAKAGUCHI, S. Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Self-Tolerance. **J. Immunol.** V 162, p 5317-5326, 1999.

JONES, ND; TURVEY, SE; MAURIK, AV; HARA, M; KINGSLEY, CI; SMITH, CH; MELLOR, AL; MORRIS, PJ; WOOD, KJ. Differential Susceptibility of Heart, Skin, and Islets Allografts to T-Cell-Mediated Rejection. **J Immunol.** V 166, p 2824-2830, 2001.

JUDGE, TA; WU, Z; ZHENG, XG; SHARPE, AH; SAYEGH, MH; TURKA, LA. The Role of CD80, CD86, and CTLA4 in Alloimmune Responses and the Induction of Long-Term Allograft Survival. **J Immunol** V 162, p 1947-1951, 1999.

KASHIWAGI, N; PORTER, KA; PENN, I; BRETTSCHEIDER, L; STARZL, TE. Studies of Homograft Sex and of Gamma Globulin Phenotypes after Orthotopic Homotransplantation of the Human Liver. **Surg Forum** V 20, p 374-76, 1969.

KINGSLEY, CI; KARIM, M; BUSHELL, R; WOOD, KJ. CD25+CD4+ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTAL-4 and IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses. **J Immunol.** V 168, p 1080-1086, 2002.

KIRK, AD; HARLAN, DM; ARMSTRONG, N; DAVIS, TA; DONG, Y; GRAY, GS; HONG, X; THOMAS, D; FECHNER, JH JR; KNECHTLE, SJ. CTLA4-Ig and Anti-CD40 Ligand Prevent Renal Allograft Rejection in Primates. **Proc Natl Acad Sci USA** V 94, p 8789-8794, 1997.

KO, S; DEIWICK, A; JÄGER, MD; DINKEL, A; ROHDE, F; FISCHER, R; TSUI, T-Y; RITTMAN, KL; WONIGEIT, K; SCHLITT, H. The Functional Relevance of Passenger Leukocytes and Microchimerism for Heart Allograft Acceptance in the Rat. **Nat Med** V 15, p 1292-1297, 1999.

KONDO, T; MORITA, K; WATARAI, Y; AUERBACH, MB; TAUB, DD; NOVICK, AC; TOMA, H; FAIRCHILD, RL. Early Increased Chemokine Migration Expression and Production in Murine Allogeneic Skin Grafts is Mediated by Natural Killer Cells. **Transplantation** V 69, p. 969-977, 2000.

KONIECZNY BT, DAI Z, ELWOOD ET, SALEEM S, LINSLEY PS, BADDOURA FK, LARSEN CP, PEARSON TC, LAKKIS FG. IFN-Gamma is Critical for Long-Term Allograft Survival Induced by Blocking the CD28 and CD40 Ligand T Cell Costimulation Pathways. **J Immunol** V 160, p 2059-2064, 1998.

KRIEGER, NR; MOST, D; BROMBERG, JS; HOLM, B; HUIE, P; SIBLEY, RK; DAFOE, DC; ALFREY, EJ. Coexistence of TH1- and TH2-Type Cytokine Profiles in Anti-CD2 Monoclonal Antibody-Induced Tolerance. **Transplantation** V 62, p 1285-1292, 1996.

KUPIEC-WEGLINSKI, JW. Graft Rejection in Sensitized Recipients. **Ann Transplant** V 1, p 34-40, 1996.

KUPIEC-WEGLINSKI, JW; DIAMANTSTEIN, T; TILNEY, NL; SROM, TB. Therapy with Monoclonal Antibody to Interleukin-2 Receptor Spares Suppressor T Cells and Prevents or Reverses Acute Allograft Rejection in Rats. **Proc Natl Acad Sci** V 83, p 2624-2627.

LAKKIS, FG; KONIECZNY, BT; SALEEM, S; BADDOURA, FK; LINSLEY, PS; ALEXANDER, DZ; LOWRY, RP; PEARSON, TC; LARSEN, CP. Blocking the CD28-B7 T Cell Costimulation Pathway Induces Long Term Cardiac Allograft Acceptance in the Absence of IL-4. **J Immunol** V 158, p 2443-2448, 1997.

LAKKIS, FG. Cytokines in Graft Rejection and Acceptance: An Ever-Shifting Paradigm. **Graft**, V 1, p 143-146, 1998.

LARSEN, CP; STEINMAN, RM; WITMER-PACK, M; HANKINS, DF; MORRIS, P; AUSTYN, JM. Migration and Maturation of Langerhans Cells in Skin Transplants and Explants. **J Exp Med**. 172, 1483-1493, 1990.

LARSEN, CP; ELWOOD, ET; ALEXANDER, DZ; RITCHIE, SC; HENDRIX, R; TUCKER-BURDEN, C; CHO, HR; ARUFFO, A; HOLLENBAUGH, D; LINSLEY, OS, WINN, KJ; PEARSON, TC. Long-Term Acceptance of Skin and Cardiac Allografts after Blocking CD40 and CD28 Pathways. **Nature** V 381, p 434-438, 1996.

LEHMANN, M; GRASER, E; RISCH, K; HANCOCK, WW, MÜLLER, A; KUTTLER, B; HAHN, H-J; KUPIEC-WEGLINSKI, JW; BROCK, J; VOLK, H-D. Anti-CD4 Monoclonal Antibody-Induced Allograft Tolerance in Rats Despite Persistence of Donor-Reactive T Cells. **Transplantation** V 64, p 1181-1187, 1997.

LJUNGGREN, HG; KARRE, K. In Search of the 'Missing Self': MHC Molecules and NK Cell Recognition. **Immunol Today** V 11, p 237-244, 1990.

LU, L; WOO, J; RAO, AS; LI, Y; WATKINS, SC; STARZL, TE; DEMETRIS, AJ; THOMSON, AW. Propagation of Dendritic Cell Progenitors from Normal Mouse Liver Using Granulocyte/Macrophage Stimulating Factor and Their Maturation Development in the Presence of Type I Collagen. **J Exp Med.** V 179, p 1823-1834, 1994.

LU, L; LI, W; ZHONG, C; QIAN, S; FUNG, J; THOMSON, AW; STARZL, TE. Increased Apoptosis of Immunoreactive Host Cells and Augmented Donor Leukocyte Chimerism, not Sustained Inhibition of B7 Molecule Expression Are Associated with Prolonged Cardiac Allograft Survival in Mice Preconditioned with Immature Donor Dendritic Cells Plus Anti-CD40L mAb. **Transplantation** V 68, p 747-757, 1999.

MAIER, S; TERTILT, C; CHAMBRON, N; GERAUER, K; HÜSER, N; HEIDECKE, C-D; PFEFFER, K. Inhibition of Natural Killer Cells Results in Acceptance of Cardiac Allografts in CD28^{-/-} Mice. **Nat Med** V 7, p 557-562, 2001.

MAKI, T; GOTTSCHALK, R; WOOD, ML; MONACO, AP. Specific Unresponsiveness to Skin Allografts in Anti-Lymphocyte Serum-Treated, Marrow Injected Mice: Participation of Donor Marrow Derived Suppressor T Cells. **J Immunol.** V127, p 1433-1438, 1981.

MARKEES, TG; PHILLIPS, NE; NOELLE, RJ; SHULTZ, LD; MORDES, JP; GREINER,

DL; ROSSINI, A. Prolonged Survival of Mouse Skin Allografts in Recipients Treated with Donor Splenocytes and Antibody to CD40 Ligand. **Transplantation** V 64, p 329-335, 1997.

MARKEES, TG; PHILLIPS, NE; GORDON, EJ; NOELLE, RJ; SHULTZ, LD; MORDES, JP; GREINER, DL; ROSSINI, AA. Long-Term Survival of Skin Allografts Induced by Donor Splenocytes and Anti-CD154 Antibody in Thymectomized Mice Requires CD4(+) T Cells, Interferon-Gamma, and CTLA4. **J Clin Invest** V 101, p 2446-2455, 1998.

MASLI, S; DE FAZIO SR; GOZZO, JJ. Requirement for Early Donor Cell Chimerism During Prolonged Survival of Murine Skin Allografts. **Transplantation** V 69, p 1667-1675, 2000.

MATHEW, JM; GARCIA-MORALES, R; FULLER, L; ROSEN, A; CIANCIO, G; BURKE, GW; CARRENO, M; TEMPLE, D; TZAKIS, AG; RICORDI, C; MILLER, J; ESQUEANZI, V. Donor Bone-Marrow Derived Chimeric Cells Present in Renal Transplantation Recipients Infused with Donor Marrow. I. Potent Regulators of Recipient Antidonor Immune Responses. **Transplantation** V 70, p. 1675-1682, 2000.

MATZINGER, P; BEVAN, MJ. Induction of H-2-Restricted Cytotoxic T Cells: In Vivo Induction Has the Appearance of Being Unrestricted. **Cell Immunol** V 33, p 92-100, 1977.

MCSHERRY, C; JACKSON, A; HERTZ, MI; BOLMAN, RM III; SAVIK, K; REINSMOEN, NL. Sequential Measurement of Peripheral Blood Allogeneic Microchimerism Levels and Association with Pulmonary Function. **Transplantation** V 62, p 1811-1818, 1996.

MONACO, AP; MAKI, T; HALE, D; UMEMURA, A; MORITA, H. The Enigma of Tolerance and Chimerism: Variable Role of T Cells and Chimerism in Induction of Tolerance with Bone Marrow. **Transplant Proc** V 33, p 3837-3839, 2001.

MORITA, H; SUGIURA, K; INABA, M; JIN, T; ISHIKAWA, J; LIAN, Z; ADACHI, Y; SOGO, S; YAMANISHI, K; TAKI, H; ADACHI, M; NOUMI, T; KAMIYAMA, Y; GOOD,

RA; IKEHARA, S. A Strategy for Organs Allografts Without Using Immunosuppressants or Irradiation. **Proc Natl Acad Sci USA** V 95, p. 6947-6952, 1998.

MORRISSEY, PJ; BRADLEY, D; SHARROW, SO; SINGER, A. T Cell Tolerance to Non-H-2 Encoded Stimulatory Alloantigens is Modulated Intrathymically but Not Prethymically. **J Exp Med.** V 158, p 365-377, 1983.

MOTTRAM, PL; HAN, WR; PURCELL, LJ; MCKENZIE, IF; HANCOCK, WW. Increased Expression of IL-4 and IL-10 and Decreased Expression of IL-2 and Interferon-Gamma in Long-Surviving Mouse Heart Allografts after Brief CD4-Monoclonal Antibody Therapy. **Transplantation** V 59, p 559-565, 1995.

NICKERSON, P; STEURER, W; STEIGER, J; ZHENG, X; STEELE, AW; STROM, TB. Cytokines and the Th1/Th2 Paradigm in Transplantation. **Curr Opin Immunol** V 6, p 757-764, 1994.

NICKERSON, P; ZHENG, XX; STEIGER, J; STEELE, AW; STEURER, W; ROY-CHAUDHURY, P; MULLER, W; STROM, TB. Prolonged Islet Allograft Acceptance in the Absence of Interleukin 4 Expression. **Transpl Immunol** V 4, p 81-5, 1996.

NICKERSON, P; STEIGER, J; ZHENG, XX; STEELE, AW; STEURER, W; ROY-CHAUDHURY, P; STROM, TB. Manipulation of Cytokine Networks in Transplantation: False Hope or Realistic Opportunity for Tolerance? **Transplantation** V 63, p 489-494, 1997.

NORIS, M; AZZOLINI, N; MISTER, M; PEZZOTTA, A; PICCININI, G; CASIRAGHI, F; CUGINI, D; PERICO, N; ORISIO, S; REMUZZI, G. Peripheral Donor Leukocytes Prolong Survival of Rat renal Allografts. **Kidney Int.** V 56, p 1101-1112, 1999.

NORIS, M; CUGINI, D; CASIRAGHI, F; AZZOLINI, N; MORAES, LDV; MISTER, M; PEZZOTTA, A; CAVINATO, RA; AIELLO, S; PERICO, N; REMUZZI, G. Thymic Microchimerism Correlates with the Outcome of Tolerance-Inducing Protocols for Solid Organ Transplantation. **J Am Soc Nephrol** V 12, 2815-2826, 2001.

ODORICO, JS; O'CONNOR, T; CAMPOS, L; BARKER, CF; POSSELT, AM; NAJI, A. Examination of the Mechanisms Responsible for Tolerance Induction after Intrathymic Inoculation of Allogeneic Bone Marrow Cells. **Ann Surg.** V 218, p. 525-533, 1993.

OLUWOLE, SF; CHOWDHURY, NC; FAWWAZ, RA. Induction of Donor-Specific Unresponsiveness to Rat Cardiac Allografts by Pretreatment with Intrathymic Donor MHC Class I Antigens. **Transplantation** V 55, p 1396-1402, 1993.

OTA, H; GOTOH, M; OHZATO, H; HE, L; TANIGAWA, T; NAGANO, H; DONO, K; TAKEDA, Y; OKUYAMA, M; SHIMIZU, J; UMESHITA, K; NAKAMORI, S; SAKON, M; NISHISHO, I; MONDEN, M. Microchimerism in Thymus is Associated With Up-Regulated T Helper Type 1 Cytokine Transcription During Cardiac Allograft Rejection in Rats. **Transplantation**, V 67, p 165-173, 1999.

PAPP, I; WIEDER, KJ; SABLINSKI, T; O'CONNELL, PJ; MILFORD, EL; STROM, TB; KUPIEC-WEGLINSKI, JW. Evidence for Functional Heterogeneity of Rat CD4+ T Cells in Vivo. Differential Expression of IL-2 and IL-4 mRNA in Recipients of Cardiac Allografts. **J Immunol** V 148, p 1308-1314, 1992.

PAUL, WE; SEDER, RA. Lymphocyte Responses and Cytokines. **Cell** V 76, p 241-251, 1994.

PICCOTTI, JR; CHAN, SY; GOODMAN, RE; MAGRAM, J; EICHWALD, EJ; BISHOP, DK. IL-12 Antagonism Induces T Helper 2 Responses, Yet Exacerbates Cardiac Allograft Rejection. **J Immunol** V 157, p 1951-1957, 1996.

POSSELT, AM; BARKER, CF; TOMASZEWSKI, JE; MARKMANN, JF; CHOTI, MA; QIAN, T; SCHACHNER, R; BRENDEL, M; KONG, S; ALEJANDRO, R. Induction of Donor-Specific Tolerance to Rat Islet Allografts by Intrathymic Inoculation of Solubilized Spleen Cell Membrane Antigens. **Diabetes** V 42, p 1544-1550, 1993.

REMUZZI, G; PERICO, N; CARPENTER, CB; SAYEGH, M. The Thymic Way to Transplantation Tolerance. **J Am Soc Nephrol** V 5, p 1639-1646, 1995.

- REMUZZI, G. Cellular Basis of Long-Term Organ Transplantation Acceptance: Pivotal Role of Intrathymic Clonal Deletion and Thymic Dependence of Bone Marrow Microchimerism-Associated Tolerance. *Am J Kid Dis* V 31, p 197-212, 1998.
- REYES J; ZEEVI, A; RAMOS, H; TZAKIS, A; TODO, S; DEMETRIS, AJ; NOUR, B; NALESNIK, M; TRUCCO, M; ABU-ELMAGD, K; FUNG, JJ; STARZL, TE. Frequent Achievement of Drug-Free State After Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc.* V 25, p 3315-3319, 1993.
- SABLINSKI, T; SAYEGH, MH; HANCOCK, WW; KUT, JP; KWOK, CA; MILFORD, EL; TILNEY, NL; KUPIEC-WEGLINSKI, JW. Differential Role of CD4+ Cells in the Sensitization and Effector Phases of Accelerated Graft Rejection. *Transplantation* V 51, p. 226-231, 1991.
- SABLINSKI, T; SAYEGH, MH; KUT, JP; TILNEY, NL; MILFORD, EL; KUPIEC-WEGLINSKI, JW. The Importance of Targeting the CD4+ T Cell Subset at the Time of Antigenic Challenge for Induction of Prolonged Vascularized Allograft Survival. *Transplantation* V 53, p. 219-221, 1992.
- SAGGI, BH; FISHER, RA; BU, D; TAWES, JW; RILEY, R; POSNER, MP. Intragraft Cytokine Expression and Tolerance Induction in Rat Renal Allografts. *Transplantation*, V 67, p 206-210, 1999.
- SAITOVITCH, D; BUSHELL, A; MABBS, DW; MORRIS, PJ; WOOD, KJ. Kinetics of Induction of Transplantation Tolerance with a Nondepleting Anti-CD4 Monoclonal Antibody and Donor-Specific Transfusion Before Transplantation: A Critical Period of Time is Required for Development of Immunological Unresponsiveness. *Transplantation* V 61, p 1642-1647, 1996.
- SALEEM, S; KONIECZNY, BT; LOWRY, RP; BADDOURA, FK; LAKKIS, FG. Acute Rejection of vascularized Heart Allografts in the Absence of IFN- γ . *Transplantation* V 62, p 1908-1911, 1996.

SAYEGH, MH; PERICO, N; GALLON, L; IMBERTI, O; HANCOCK, WW; REMUZZI, G; CARPENTER, CB Mechanisms of Acquired Thymic unresponsiveness to Renal Allografts. **Transplantation** V 58, p 125-132, 1994.

SAYEGH, MH; AKALIN, E; HANCOCK, WW; RUSSELL, ME; CARPENTER, CB; LINSLEY, OS; TURKA, LA. CD28-B7 Blockade after Alloantigenic Challenge in Vivo Inhibits Th1 Cytokines but Spares Th2. **J Exp Med** V 181, p 1869-1874, 1995.

SAYEGH, MH; ZHENG, XG; MAGEE, C; HANCOCK, WW; TURKA, LA. Donor Antigen Is Necessary for the Prevention of Chronic Rejection in CTLA4-Ig-Treated Murine Cardiac Allograft Recipients. **Transplantation** V 64, p 1646-1650, 1997.

SCHLITT, HJ; KANEHIRO, H; RADDATZ, G; STEINHOFF, G; RICHTER, N; NASHAN, B; RINGE, B; WONIGEIT, K; PICHLMAYR, R. Persistence of Donor Lymphocytes in Liver Allografts Recipients. **Transplantation** V 56, p 1001-1007, 1993.

SCHLITT, HJ; HUNDRIESER, J; HISANAGA, M; UTHOFF, K; KARCK, M; WAHLERS, T; WONIGEIT, K; PICHLMAYR, R. Patterns of Donor-Type Microchimerism after Heart Transplantation. **Lancet** V 343, p 1469-1471, 1994.

SCHLITT, HJ; HUNDRIESER, J; RINGE, B; PICHLMAYR, R. Donor-Type Microchimerism Associated with Graft Rejection Eight Years after Liver Transplantation. **N Engl. J Med.** V 330, p 646-647, 1994a.

SCHULER, G; STEINMAN, RM. Murine Epidermal Langerhans Cells Mature into Potent Immunostimulatory Dendritic Cells In Vitro. **J Exp Med.** V 161, p 526-546, 1985.

SCULLY, R; QIN, S; COBBOLD, S; WALDMANN, H. Mechanisms in CD4 Antibody-Mediated Transplantation Tolerance: Kinetics of Induction, Antigen Dependency and Role of Regulatory T Cells. **Eur J Immunol.** V 24, p 2383-2392, 1994.

SHENG-TANNER, X; MILLER, RG. Correlation Between Lymphocyte-Induced Donor-Specific Tolerance and Donor Cell Recirculation. **J Exp Med V** 176, p 407-413, 1992.

SHIRASUGI, N; ADAMS AB; DURHAM, MM; LUKACHER, AE; XU, H; REES, P; COWAN, SR; WILLIAMS, MA; PEARSON, TC; LARSEN, CP. Prevention of Chronic Rejection in Murine Cardiac Allografts: A Comparison of Chimerism – and Nonchimerism-Inducing Costimulation Blockade-Based Tolerance Induction Regimens. **J Immunol V**169, p 2677-2684, 2002.

SIEGLING, A; LEHMANN, M; RIEDEL, H; PLATZER, C; BROCK, J; EMMRICH, F; VOLK, HD. A Non-Depleting Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody which Suppresses T-Helper 1-Like but not T-Helper 2-Like Intragraft Lymphokine Secretion Induces Long Term Survival of Renal Allografts. **Transplantation V** 57, p 464-467, 1994.

SRIWATANAWONGSA, V; DAVIES, HFFS; BRONS, IGM; ASPINAL, R; THIRU, S; JAMIESON, NV; CALNE, RY. Continued Presence of Donor Leukocytes in Recipients of Liver Grafts. **Transplant Proc. V** 25, p371-372, 1993.

STARZL, TE; DEMETRIS, AJ; MURASE, N; ILDSTAD, S; RICORDI, C; TRUCCO, M. Cell Migration, Chimerism and Graft Acceptance. **Lancet V** 339, p 1579-1582, 1992.

STEIGER, B; NICKERSON, PW; STEURER, W; MOSCOVITCH-LOPATIN, M; STROM, JB. IL-2 Knockout Recipient Mice Reject Islet Cell Allografts. **J Immunol V** 155, p 489-498, 1995.

STEIGER, JU; NICKERSON, PW; HERMLE, M; THIEL, G; HEIM, MH. Interferon-Gamma Receptor Signaling Is not Required in the Effector Phase of the Alloimmune Response. **Transplantation V** 65, p 1649-1652, 1998.

STEVENS, HP; VAN DER KWAST, THE; VAN DER MEIDE, PH; VUZEVSKI, VD; BUURMAN, WA; JONKER, M. Synergistic Immunosuppressive Effects of Monoclonal Antibodies Specific for Interferon-Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha. A Skin Transplantation Study in the Rhesus Monkey. **Transplantation V** 50, p 856-861, 1990.

STINN, JL; TAYLOR, MK; BECKER, G; NAGANO, H; HASEGAWA, S; FURAKAWA, Y; SHIMIZU, K; LIBBY, P; MITCHELL, RN. Interferon- γ -Secreting T-Cell Populations in Rejecting Murine Cardiac Allografts. Assessment by Flow Cytometry. **Am J Pathol V** 153, p 1383–1392, 1998.

STUMBLES, P; MASON D. Activation of CD4+ T Cells in the Presence of a Nondepleting Monoclonal Antibody to CD4 Induces a Th2-Type response In Vitro. **J Exp Med. V** 182, p 5-13, 1995.

SUBERBIELLE, C; CAILLAT-ZUCMAN, S; LEGENDRE, C; BODEMER, C; NOEL, LH, KREIS, H; BACH, JF. Peripheral Microchimerism in Long-Term Cadaveric-Kidney Allograft Recipient. **Lancet V** 343, p 1468-1469, 1994.

SUN, J; SHEIL, AGR; WANG, C; WANG, L; ROKAHR, K; SHARLAND, A; JUNG, S; LI, L; MCCAUGHAN, GW; BISHOP, GA. Tolerance to Rat Liver Allografts. IV. Acceptance Depends on the Quantity of Donor Tissue and on Donor Leukocytes. **Transplantation V** 62, p 1725-1730, 1996.

TAKEUCHI, T; LOWRY, RP; KONIECZNY, B. Heart Allografts in Murine Systems. **Transplantation V** 53, p 1281-1294, 1992.

UMEMURA, A; MONACO, AP; MAKI, T. Donor T Cells are not Required for Induction of Allograft Tolerance in Mice Treated with Antilymphocyte Serum, Rapamycin, and Donor Bone Marrow Cells. **Transplantation V** 70, p 1005-1009, 2000a.

VELLA, JP; VOS, L; CARPENTER, CB; SAYEGH, MH. Role of Indirect Allorecognition in Experimental Late Acute Rejection. **Transplantation V** 64, p 1823-1828, 1997.

VINCENTI, F; KIRKMAN, R; LIGHT, S; BUMGARDNER, G; PESCOVITZ, M; HALLORAN, P; NEYLAN, J; WILKINSON, A; EKBERG, H; GASTON, R; BACKMAN, L; BURDICK, J. Interleukin-2-Receptor Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. **N Engl J Med V** 15, p 161-165, 1998.

WEKERLE, T; KURTZ, J; ITO, H; RONQUILLO, JV; DONG, V; ZHAO, G; SHAFFER, J; SAYEGH, MH, SYKES, M. Allogeneic Bone Marrow Transplantation with Co-Stimulatory Blockade Induces Macrochimerism and Tolerance without Cytoreductive Host Treatment. **Nat Med.** V 6, p 464-469, 2000.

WEKERLE, T; SYKES, M. Chimerism as an Approach for the Induction of Transplantation Tolerance. **Transplantation** V 68, p 459-467, 1999.

WILLIAMS, MA; TRAMBLEY, J; HÁ, J; ADAMS, AB; DURHAM, MM, REES, P; COWAN, SR; PEARSON, TC; LARSEN, CP. Genetic Characterization of Strain Differences in the Ability to Mediate CD40CD28-Independent Rejection of Skin Allografts. **J Immunol.** V 165, p 6849-6857, 2000.

WITMER-PACK, M; OLIVER, W; VALINSKY, J; SCHULER, G; STEINMAN, RM. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor is Essential for the Viability and Function of Cultured Murine Epidermal Langerhans Cells. **J Exp Med.** V 166, p 1484-1498, 1987.

YAN, Y; SHASTRY, S; RICHARDS, C; WANG, C; BOWEN, D; SHARLAND, A; PAINTER, D; MCCAUGHAN, GW; BISHOP, GA. Posttransplant Administration of Donor Leukocytes Induces Long-Term Acceptance of Kidney or Liver Transplants by an Activation-Associated Immune Mechanism. **J Immunoi** V 166, p 5258-5264, 2001.

YANG, L; DUTEMPLE, B; KHAN, Q; ZHANG, L. Mechanisms of Long-Term Donor-Specific Allograft Survival Induced by Pretransplant Infusion of Lymphocytes. **Blood** V 91, p. 324-330, 1998.

ZHAI, Y; MENG, L; GAO, F; BUSUTTIL, RW; KUPIEC-WEGLINSKI, JW. Allograft Rejection by Primed/Memory CD8⁺ T Cells is CD154 Blockade Resistant: Therapeutic Implications for Sensitized Transplant Recipients. **J Immunol** V 169, p 4667-4673, 2002.

ZHENG, XX; STEELE, AW; NICKERSON, PW; STEURER, W; STEIGER, J; STROM, TB. Administration of Noncytolytic IL-10/Fc in Murine Models of Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock and Allogeneic islet Transplantation. *J Immunol* V 154, p 5590-600, 1995.