

ELAINE KAWANO HORIBE

**CÉLULAS DENDRÍTICAS CONDICIONADAS
COM RAPAMICINA E PULSADAS COM
ALOANTÍGENOS NA SOBREVIVÊNCIA DE
TRANSPLANTES CUTÂNEOS ALÓGENOS
MICROCIRÚRGICOS EM RATOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2007

ELAINE KAWANO HORIBE

**CÉLULAS DENDRÍTICAS CONDICIONADAS
COM RAPAMICINA E PULSADAS COM
ALOANTÍGENOS NA SOBREVIVÊNCIA DE
TRANSPLANTES CUTÂNEOS ALÓGENOS
MICROCIRÚRGICOS EM RATOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR ESTRANGEIRO: Prof. Dr. W.P Andrew Lee

CO-ORIENTADOR ESTRANGEIRO: Profa. Dra. Maryam Feili-Hariri

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. An Wan Ching

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Gal Moreira Dini

**SÃO PAULO
2007**

Horibe, Elaine Kawano Horibe.

Células dendríticas condicionadas com rapamicina e pulsadas com aloantígenos na sobrevida de transplantes cutâneos alógenos microcirúrgicos em ratos. /Elaine Kawano Horibe – São Paulo, 2007
xix, 89 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: **Rapamicin-conditioned, alloantigen pulsed dendritic cells and increase in survival of vascularized skin grafts transplanted across a strong MHC mismatch, in rats.**

1. Transplante de tecidos, 2. Imunologia de transplantes, 3. Rapamicina, 4. Imunossupressão

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA**

COORDENADOR: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

Aos meus amados pais,

EDITH E KOSE

Ao meu irmão e amigo,

VÍTOR

Ao meu companheiro de todas as horas,

DENNIS

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo.

Por todas as orientações na elaboração desta tese.

Pela oportunidade única de realizar parte deste estudo na Universidade de Pittsburgh, através do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Pelos valiosos ensinamentos sobre elaboração de pesquisa com rigor científico.

Pelo exemplo incomparável de paixão à pesquisa, determinação e liderança.

Pelas orientações, incentivo e suporte moral que têm sido tão importantes em minha vida desde o meu tempo de aluna de medicina.

Ao Prof. Dr. W.P. Andrew Lee, chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, Orientador de Pesquisas do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh.

Por me receber como “*research fellow*” em seu Serviço.

Pela oportunidade de realizar parte desta tese no Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh.

Pelas constantes orientações científicas a este trabalho.

Pelo suporte financeiro parcial à execução deste estudo e às apresentações do mesmo em congressos americanos.

Pelo incentivo para meu crescimento pessoal, ensinando a pensar grande e que tudo é possível.

À Profa. Dra. Maryam Feili-Hariri, Professora Adjunta do Departamento de Cirurgia e do Departamento de Imunologia da Universidade de Pittsburgh.

Por todos os valiosos ensinamentos em Imunologia.

Pela orientação minuciosa e constante no planejamento, execução e revisão deste estudo.

Pelo apoio e incentivo em todos os momentos da execução desta obra.

Pela estimada amizade.

Ao Prof. Dr. Gal Moreira Dini, Professor Afiliado, Coordenador do Setor de Rinoplastia da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade e pela valiosa contribuição nas sugestões e revisão desta obra na qualidade de co-orientador.

Ao Prof. An Wan Ching, Professor e Coordenador do Setor de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, incentivo e imprescindíveis sugestões e revisão desta obra, na qualidade de co-orientador.

Ao Prof. Dr. Angus Thomson, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e do Departamento de Imunologia da Universidade de Pittsburgh e diretor do Setor de Imunologia em Transplantes do Thomas E. Starzl Institute da Universidade de Pittsburgh.

Pela orientação no desenho experimental para estudo do mecanismo de tolerância.

Pela orientação na interpretação dos resultados e revisão do trabalho.

Pelo exemplo de grande pesquisador de amplos conhecimentos, humildade e talento para o ensino.

À Prof. Dra. Kacey Marra, Diretora do Laboratório de Cirurgia Plástica, por ter me recebido no laboratório, dando suporte administrativo e pela amizade.

Ao Dr. Justin M. Sacks, cirurgião plástico, pesquisador do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pela amizade, excelente parceria nos transplantes microcirúrgicos dos retalhos cutâneos alógenos e auxílio nas avaliações pós-operatórias dos animais.

Ao Dr. Jignesh Unadkat, cirurgião geral, pesquisador do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos imunológicos in vitro e nas avaliações pós-operatórias dos animais.

Ao Dr. Giorgio Raimondi, pesquisador do Thomas Starzl E. Institute, pelas brilhantes sugestões nos experimentos para estudo do mecanismo de tolerância e auxílio para execução e interpretação dos mesmos.

Ao Dr. Zhiliang Wang, cirurgião geral e professor assistente em pesquisa do Thomas Starzl E. Institute, pelos ensinamentos e orientações em imunohistoquímica e auxílio no preparo e análise das lâminas.

Ao Dr. Ryosuke Ikeguchi, ortopedista, pesquisador do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pelo auxílio nas avaliações pós-operatórias dos animais.

Ao Programa de Pós Graduação em Cirurgia Plástica da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela imensa oportunidade de contribuir para o avanço científico do Brasil e de promover a integração de conhecimentos entre centros de pesquisa nacionais e internacionais.

A todos os docentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pelo intercâmbio de conhecimentos, apoio e sugestões.

Ao Centro de Imagenologia Biológica (*Center for Biological Imaging*) da Universidade de Pittsburgh, pela valiosa assistência na elaboração das imagens imunofluorescentes.

À Nina Beedle, secretária da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pela organização dos documentos que possibilitaram minha vinda e estada à Universidade de Pittsburgh.

Ao Douglas Marsteller, técnico do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh, pelo auxílio nos experimentos in vitro.

À Sandra da Silva, Marta Rejane e Silvana S. Oliveira, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela atenção, apoio e incentivo durante a elaboração deste trabalho.

À Valdete Lopes, técnica em assuntos educacionais da CAPES, pela ajuda na realização do Programa PDEE da CAPES.

Ao Marcelo, funcionário da Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pela ajuda administrativa na realização do Programa PDEE da CAPES.

**CÉLULAS DENDRÍTICAS CONDICIONADAS COM
RAPAMICINA E PULSADAS COM ALOANTÍGENOS NA
SOBREVIDA DE TRANSPLANTES CUTÂNEOS ALÓGENOS
MICROCIRÚRGICOS EM RATOS**

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro das entidades:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Plastic Surgery Educational Foundation (PSEF)

American Society for Surgery of the Hand (ASSH)

PUBLICAÇÕES DA TESE

- 1) Horibe EK, Sacks JM, Unadkat J, Wang Z, Raimondi G, Ikeguchi R, Marsteller D, Ferreira LM, Thomson AW, Lee WP, Feili-Hariri M. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. *Transpl Immunol*. 2008 Feb;18(4):307-18

- 2) Horibe EK, Sacks JM, Aksu AE, Unadkat J, Song DY, Ferreira LM, Feili-Hariri M, Lee WPA. Strauch's Technique for Epigastric Free Flaps in Rats Revisited: A Simple and Effective Method to Increase Patency Rates. *J Reconstr Microsurg*. 2007 Oct 31 (Epub ahead of print, acessado em 20 de janeiro de 2008)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii.
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTAS.....	xii
RESUMO.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	6
4. MÉTODOS.....	28
5. RESULTADOS.....	49
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	73
8. REFERENCIAS.....	75
NORMAS ADOTADAS.....	83
SUMMARY.....	84
ANEXO.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada para o retalho epigástrico de Strauch Murray. Preparo do pedículo no rato doador.....	35
Figura 2. Preparo do pedículo do receptor segundo a técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada.....	36
Figura 3. Preparo para realização da 1ª anastomose arterial da região inguinal direita segundo a técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada.....	37
Figura 4. Segunda anastomose arterial no receptor segundo a técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada.....	38
Figura 5. Anastomose venosa no receptor segundo a técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada.....	39
Figura 6. Desenho ilustrando o aspecto final do pedículo do retalho epigástrico preparado com a técnica “ <i>flow-through</i> ” simplificada.....	40
Figura 7. Aspecto final das anastomoses microcirúrgicas empregadas na técnica “ <i>flow through</i> ” simplificada, visto com aumento de 25x através de microscópio.....	41
Figura 8A. Análise por citometria de fluxo do fenótipo das células dendríticas geradas com fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos e rapamicina	48
Figura 8B. Análise da pureza da suspensão celular obtida a partir da cultura de células dendríticas geradas com fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos e rapamicina.....	48
Figura 9A. Porcentagens de células das DC controle e das DC GM+Rapa que foram marcadas com os anticorpos indicados, analisados com citometria de fluxo.....	49

Figura 9B.	Porcentagens de DC das populações controle e GM+Rapa ativadas por 24 horas com LPS (2 experimentos por população) que foram marcadas com os anticorpos indicados.....	49
Figura 10.	Produção de citocinas pró e anti-inflamatória 24 horas pelas DC controle e DC GM+Rapa após a estimulação de TLR.....	50
Figura 11.	Proliferação de linfócitos T singênicos em reação mista de linfócitos com DC controle, DCp controle, DC GM+Rapa e DCp GM+Rapa.....	51
Figura 12.	Sobrevida dos retalhos epigástricos cutâneos alógenos microcirúrgicos após emprego dos diferentes protocolos de tratamento.....	53
Figura 13.	Produção de citocinas pró e anti-inflamatória (IFN- γ IL-10) pelas células mielóides de sangue periférico (CMSP) de receptores tratados com DC controle, DC controle pulsadas com aloantígenos (DCp Controle), medula óssea (MO) e DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos (DCp GM+Rapa), nos 30°,100° e 150° dia pós transplante.....	56
Figura 14.	Cortes histológicos ilustrando as camadas da pele de rato de raça receptora sem tratamento, de retalhos epigástricos cutâneos alógenos microcirúrgicos do grupo controle durante a rejeição e do grupo +DCp GM+Rapa no 180° dia após o transplante.....	58
Figura 15.	Análise imunofluorescente de células T Foxp3+CD4+ nos linfonodos inguinais..	60
Figura 16.	Análise quantitativa dos cortes de baços corados com técnica imunofluorescente.....	61
Figura 17A	Gráfico representativo ilustrando a expressão de Foxp3 e CD4 à citometria de fluxo em células T purificadas com malha de náilon (<i>nylon wool</i>).....	62
Figura 17B	Cortes histológicos com técnica imunofluorescente para corar células T Foxp3+CD4+ de baço de ratos.....	62
Figura 18.	Quantificação de células coradas nas secções de baço tratadas com técnica imunofluorescente.....	63

Figura 19.	Marcações do retalho epigástrico.....	85
Figura 20.	Dissecção do retalho epigástrico, realizado no sentido medial - lateral, no plano pré-aponeurótico da parede abdominal.....	86
Figura 21.	Modelo experimental de retalho epigástrico descrito por Strauch. Preparo do pedículo no rato doador.....	87
Figura 22.	Anastomose término-terminal entre vasos femorais de doador e receptor, segundo a técnica microcirúrgica descrita por Strauch.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição dos 41 ratos receptores segundo o grupo experimental.....	33
Quadro 2. Classificação histológica de Buttemeyer para rejeição cutânea em transplantes de retalhos compostos alógenos.....	42
Quadro 3. Sobrevida dos retalhos nos grupos com diferentes protocolos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac	anticorpo
Ag	antígeno
aloAg	aloantígeno (s)
Alphabeta-TCRmAb	anticorpo monoclonal anti-receptor alphabeta das células T
Anti-TCR	<i>anti T cell receptor</i> (anti-receptor de células T)
CAA	células apresentadoras de antígenos
DC	células dendríticas
DC GM+IL-4	células dendríticas derivadas de medulla óssea de ratos de raça doadora, cultivadas com GM-CSF e IL-4
DCp	células dendríticas pulsadas com aloantígenos
DCp GM+IL-4	células dendríticas derivadas de medula óssea de ratos de raça doadora, cultivadas com GM-CSF e IL-4 e pulsadas com aloantígenos
DCp GM+Rapa	células dendríticas derivadas de medula óssea de ratos de raça doadora, condicionadas com GM-CSF e rapamicina e pulsadas com aloantígenos
CpG	citossina-poli-guanina
CsA	ciclosporina A
CT	células tronco mesenquimais
DAPI	4,6 diamidino-2-fenilindole
DI	drogas imunossupressoras
DMSO	dimetilsulfóxido
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
HLA	<i>human leucocytes antigens</i> (antígenos de leucócitos humanos)
IFN- γ	interferon γ
IL-10	interleucina 10
IL12p70	interleucina 12p70

IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina-6
Kg	kilogramo
LBN	Lewis-Brown-Norway
Lew	Lewis
LN	linfonodo
LPS	lipopolissacarídeo
mg	miligramo
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
mm	milímetro
MO	medula óssea
NOD	não obesos diabéticos
RA	rejeição aguda
RCA	retalhos compostos alógenos
RCuA	retalhos cutâneos alógenos
SAL	soro anti-linfocitário
SD	Sprague Dawley
TGF- β	<i>transforming growth factor</i> β (fator de crescimento transformador β)
Th1	linfócitos T auxiliares 1
Th2	linfócitos T auxiliares 2
TLR	<i>toll like receptor</i> (receptor <i>toll like</i>)
TMO	transplante de medula óssea
Treg	células T reguladoras (neste estudo, células T Foxp3+CD4+)
WF	Wistar Furth

RESUMO

Objetivos: Comparar o fenótipo e capacidade estimulatória *in vitro* de populações de células dendríticas (DC) de ratos; testar estas populações celulares na sobrevida de retalhos cutâneos alógenos (RcuA); avaliar os mecanismos pelos quais as DC condicionadas com rapamicina e pulsadas com lisado de hospedeiro, em associação a uma curta administração de drogas imunossupressoras e soro anti-linfocitário atuam na sobrevida de RcuA. **Métodos:** As DC foram condicionadas com rapamicina (DC GM+Rapa) ou IL-4 (DC controle), sendo pulsadas ou não com aloantígenos de doador. O fenótipo e função das células foram comparados *in vitro*. Testou-se o potencial destas DC de aumentar a sobrevida de RcuA e comparou-se a hiporesponsividade doadora-específica dos receptores de RcuA. Avaliou-se e quantificou-se a presença das células T reguladoras Foxp3+CD4+ (Tregs) nos retalhos transplantados e nos órgãos linfóides secundários com citometria de fluxo e imunofluorescência. **Resultados:** As DC GM+Rapa expressaram níveis menores de MHCII e CD40 e apresentaram menor capacidade para estimular células T em reação mista de linfócitos. Ao estímulo com LPS, as DC GM+Rapa produziram níveis significativamente menores de IL-6 e IL-10. Somente as DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos aumentaram significativamente a sobrevida dos retalhos cutâneos alógenos (>180 dias). Células T periféricas em receptores com sobrevida prolongada de RcuA mostraram hiporesponsividade doadora-específica. Quantidades significativamente maiores de Tregs foram encontradas nos retalhos com sobrevida prolongada e nos órgãos linfóides secundários destes receptores. **Conclusões:** As DC GM+Rapa apresentaram fenótipo mais imaturo e menor capacidade de estimulação de células T do que a população controle. A administração de DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos prolongou significativamente a sobrevida dos RcuA, sendo este fato associado à expansão de Tregs.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Retalhos compostos alógenos têm grande potencial para suprir a necessidade de tecidos autólogos em reconstruções após grandes perdas de tecidos moles, fato provado pelos casos já registrados no mundo: 24 transplantes de mãos, antebraços e dígitos ¹ (LANZETTA et al. 2005), nove transplantes de parede abdominal ² e um caso de transplante de face ³. Em realidade, a maioria dos transplantes de retalhos compostos homólogos (de um indivíduo para o outro) não é vital à sobrevivência dos pacientes, ao contrário do que ocorre com os transplantes de órgãos. Nestes casos, os pacientes são obrigados a tolerar o regime imunossupressor contínuo e as diversas reações adversas associadas, como citotoxicidade, aumento da susceptibilidade a infecções, tumores e episódios de rejeição, que ainda podem ocorrer apesar da aderência ao regime imunossupressor ^{4,5}. Devido aos efeitos colaterais associados necessários à manutenção de um elemento não essencial à sobrevivência, o emprego de retalhos compostos alógenos tem sido considerado controverso ^{4,5}.

Ademais, a aceitação de um retalho composto alógeno apresenta outros obstáculos peculiares. Estes retalhos, como implícito no próprio nome, são compostos por mais de um tipo de tecido, possuindo diferentes graus de antigenicidade e provocando diferentes respostas imunes no receptor ^{4,5}. Sabe-se que a pele é o órgão que apresenta maior antigenicidade e frequentemente está presente nos retalhos compostos alógenos em grande quantidade. Portanto é comum a ocorrência de episódios de rejeição aguda no componente cutâneo dos retalhos compostos, apesar do uso constante de drogas imunossupressoras ^{1,4,5} (LANZETTA et al., 2005; FERREIRA, 1994; BENHAIM et al., 1996).

Para que os retalhos compostos alógenos sejam mais utilizados em reconstruções de grandes perdas de tecido, é imperativo que sejam elaboradas novas alternativas

imunossupressoras, livres de efeitos colaterais e suficientemente potentes para ultrapassar a barreira da antigenicidade cutânea.

Pesquisas em prevenção a episódios de rejeição aguda em retalhos compostos alógenos têm utilizado vários protocolos e modelos experimentais, porém até o momento não há consenso sobre qual é a terapia e o modelo experimental ideal para o estudo da antigenicidade da pele. Na literatura, existem estudos bem-sucedidos na promoção de tolerância operacional de patas traseiras alógenas em ratos, utilizando terapias celulares associadas ou não a drogas imunossupressoras por um curto período ^{6,7} (FERREIRA et al., 1995; GORANTLA et al., 2003). Entretanto, estes resultados podem não ser tão encorajadores se as mesmas estratégias forem transferidas para a prática clínica, visto que o suprimento constante de células de medula óssea (MO) provenientes do fêmur da pata transplantada pode facilitar a aceitação do enxerto, requerendo uma terapia imunossupressora menos agressiva. Já a aceitação de um transplante de mão humana, pobre em medula óssea, depende de doses maiores e mais prolongadas de drogas imunossupressoras.

Por outro lado, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a promoção de tolerância operacional a retalhos cutâneos alógenos (RCuA), mesmo utilizando estratégias de comprovada eficácia no modelo de pata traseira de ratos ^{8,9} (SIEMIONOW, IZYCKI e ZIELINSKI, 2003; DEMIR et al., 2005). A literatura mostra que é muito mais difícil aumentar a sobrevida de retalhos cutâneos alógenos do que de qualquer outro órgão ou tecido transplantado. ^{8,10-12} (LIM e LI, 1991; CARRAMASCHI et al., 2000; DEMIR et al., 2005; SIEMIONOW, DEMIR et al., 2005). Também é mais difícil aumentar a sobrevida de RCuA do que de enxertos de pele. Isto pode ser explicado pela possibilidade de migração dos aloantígenos (aloAg) do RCuA para os vários órgãos secundários do receptor via corrente sanguínea, fato que não ocorre após enxertia de pele, a qual é seguida de apresentação direta dos aloAg ^{13,14} (LEE et al., 1991; OCHANDO et al., 2006). Ademais, células imunocompetentes provenientes da corrente sanguínea podem acelerar o dano às

células cutâneas ¹⁵ (KANITAKIS et al., 2003). A tolerância a enxertos cutâneos foi atingida com diversos protocolos ¹⁶⁻¹⁸ (GRACA, COBBOLD e WALDMANN, 2002; LU et al., 2006; LEE et al., 2006) porém na literatura ainda não há relatos de aceitação de RCuA por períodos prolongados após suspensão de drogas imunossupressoras, apesar de tentativas nesta direção ^{8,12} (DEMIR et al., 2005; SIEMIONOW, DEMIR et al., 2005).

As células dendríticas (DC), iniciadoras das respostas imunes *in vivo*, podem também regular o sistema imune. Sua capacidade de promover aceitação de tecidos alógenos transplantados tem evidenciado um novo horizonte, devido à possibilidade de abreviar o uso de drogas imunossupressoras (DI). Esta característica tem sido demonstrada por vários subtipos de DC derivadas MO. Quando propagadas em baixas concentrações de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), DC mielóides promovem hipo-responsividade aloantígeno-específica de células T ¹⁹ (LU et al., 1995) e aumento de sobrevida de órgão transplantado ^{20,21} (FU et al., 1996; LUTZ et al., 2000). A utilização adicional de substâncias modulatórias pode tornar os fenótipos mais estáveis, mantendo suas características *in vivo* por mais tempo, como ilustrado por estudos bem-sucedidos no aumento da sobrevida de transplantes cardíacos alógenos em roedores. Nestes estudos, os animais receptores foram tratados com DC preparadas de diversas formas e portanto com diferentes características: DC imaturas, aderentes, derivadas de MO, geradas com GM-CSF e interleucina 4 (IL-4) ²² (PECHE et al., 2005); DC mielóides propagadas em IL-10 e TGF- β e subsequentemente estimulada por LPS ²³ (LAN et al., 2006); DC tratadas com rapamicina, pulsadas com lisados de doador ²⁴ (TANER et al., 2005); ou DC derivadas de MO, pulsadas com peptídeo 5 tímico ²⁵ (ALI et al., 2000).

Apesar das DC terem sido utilizadas com sucesso em protocolos para indução de tolerância a órgãos sólidos, ainda não há relatos de que tenham promovido aceitação prolongada de retalhos compostos alógenos ou RCuA.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- 1- Comparar os fenótipos de diferentes DC derivadas de MO de ratos e suas respectivas capacidades de estimulação de células T *in vitro*.
- 2- Testar o efeito destas populações de DC, associadas a uma curta administração de drogas imunossupressoras e soro anti-linfocitário na sobrevida de RCuA.
- 3- Avaliar os mecanismos pelos quais as DC condicionadas com rapamicina e pulsadas com aloantígenos atuam na sobrevida de RCuA.

Literatura

3. LITERATURA

A fim de facilitar a leitura as principais obras referentes ao tema foram divididas em três tópicos. Os trabalhos serão apresentados em ordem cronológica, obedecendo à terminologia empregada pelos autores.

3.1. Relevância clínica dos transplantes de retalhos compostos alógenos

GILBERT (1964) transplantou o antebraço e a mão de um cadáver utilizando prednisona, azatioprina e radiação local como tratamento imunossupressor. O sucesso inicial foi seguido pela rejeição no 14º dia ²⁶.

DUBBERNARD et al (1999) publicaram o relatório de 6 meses do primeiro transplante de mão realizado na era moderna. Em setembro de 1998, os autores transplantaram o antebraço distal direito e a mão de um cadáver de 41 anos para um homem de 48 anos que havia sofrido amputação traumática do terço distal do antebraço direito. A terapia imunossupressora incluiu globulinas anti-timócitos, tacrolimo, ácido micofenólico e prednisona. A terapia de manutenção incluiu os mesmos agentes, porém sem as globulinas. Foram observados sinais clínicos e histológicos leves de rejeição cutânea 8 a 9 semanas após a cirurgia. Estes sinais desapareceram após o aumento da dose de prednisona (de 20 mg/dia para 40 mg/dia) e a aplicação tópica de cremes imunossupressores (tacrolimo, clobetasol). Os autores acreditavam que a imunossupressão utilizada era eficaz na prevenção de rejeição aguda e que se não houvesse mais episódios de rejeição, o prognóstico funcional do RCA humano seria semelhante, ou até melhor do que os casos submetidos a auto-reconstrução ²⁷.

KANITAKIS et al 2003 relataram a evolução clínica do primeiro transplante de mão alógena em humanos. O mesmo foi removido 29 meses após o transplante devido à rejeição irreversível do retalho, causado pela não aderência do paciente ao tratamento imunossupressor. Relataram que a partir do 15º mês, o componente cutâneo do retalho apresentou pápulas liquenóides que progressivamente se espalharam e coalesceram em lesões difusas eritemato-descamativas. A análise anátomo-patológica mostrou que as alterações mais graves manifestaram-se na pele; inflamação leve foi encontrada nos músculos e tendões. Ossos e tendões foram poupados. Concluíram que a pele é o principal alvo de rejeição em mãos alógenas transplantadas ¹⁵.

LEVI et al (2003) reportaram suas experiências iniciais com alotransplantes de parede abdominal provenientes de cadáveres, para fechamento de abdômen de pacientes submetidos a transplante de intestino. Os autores transplantaram nove paredes abdominais em 8 pacientes. O suprimento sanguíneo do retalho foi proveniente dos vasos epigástricos inferiores. Sete dos oito pacientes receberam alemtuzumab na indução e tacrolimo para manutenção. Biópsias de pele foram realizadas aleatoriamente e à suspeita de rejeição. Destes oito pacientes, seis sobreviveram; cinco dos quais tem retalhos alógenos de paredes abdominais intactas. Dois pacientes apresentaram episódios leves de rejeição aguda que foram resolvidos com corticoterapia. Os autores concluíram que este procedimento é uma boa alternativa a pacientes que necessitam ser submetidos a transplante de intestino ²⁸.

PETIT et al (2003) publicaram uma revisão sobre os casos clínicos de RCA já realizados no mundo. Mencionaram que o primeiro transplante de mão da era moderna, realizado em Lion em 1998, trouxe grande controvérsia ao meio médico. Apesar disso, dez pacientes receberam transplantes de mão, de 1998 a 2003 e outros pacientes receberam transplantes de joelho e laringe. Os autores defendem a utilização dos retalhos cutâneos alógenos, referindo que não se trata de uma técnica nova, mas uma nova aplicação que associa princípios da microcirurgia reconstrutora com os dos transplantes de órgãos. Em seu propósito (correção de defeitos físicos), objetivo (reconstrução de estruturas anatômicas

idênticas), e técnica (transferência de tecidos vascularizados), o uso dos retalhos compostos alógenos representa a essência da cirurgia reconstrutora. Os autores apresentam vários benefícios em relação à reconstrução utilizando tecidos autógenos, tais como: ausência de morbidade de área doadora; o fato do resultado ser imediato, não necessitando de vários tempos cirúrgicos; neurotização do retalho composto, com maior potencial para ser funcional; e aspecto estético natural. Apesar destes benefícios, os efeitos colaterais da imunossupressão crônica ainda limitam o uso mais abrangente dos retalhos compostos alógenos na cirurgia reconstrutora. Os autores relatam que pesquisas em vários laboratórios já vislumbram uma redução significativa da necessidade de imunossupressão, porém mais pesquisas são necessárias para que o emprego de retalhos compostos alógenos seja mais disseminado²⁹.

LANZETTA et al (2005) relataram as informações iniciais coletadas pelo International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation (IRHCTT). Este órgão foi criado em 2002, com intenção de registrar informações detalhadas sobre todos os casos de transplantes de retalhos compostos alógenos realizados desde 1998, possibilitando assim a oportunidade dos participantes manterem-se atualizados sobre os últimos desenvolvimentos. O relatório inicial ofereceu uma revisão dos casos realizados entre setembro de 1998 e setembro de 2004. Em resumo, relataram que 18 pacientes do sexo masculino foram submetidos a 24 transplantes de mão/antebraço/dígitos (11 transplantes de mão monolaterais e 4 bilaterais, 2 transplantes de antebraços bilaterais, e 1 transplante de dedo). Todos os pacientes sobreviveram. Todos os retalhos sobreviveram no primeiro e no segundo ano após a cirurgia. Após este período, houve dois casos de rejeição aos retalhos em pacientes não aderentes ao tratamento. Observaram-se episódios de rejeição aguda na pele do retalho alógeno de 12 pacientes no primeiro ano após o transplante. Entre os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras, os mais comuns foram infecções oportunistas e complicações metabólicas. Todos os pacientes desenvolveram sensibilidade protetora, e 17 pacientes também atingiram sensibilidade discriminativa. A recuperação da função de

músculos extrínsecos e intrínsecos possibilitou a realização da maioria das tarefas diárias. Os autores concluíram que apesar da enorme carga antigênica, os transplantes de mão tornaram-se uma realidade clínica, com necessidade de imunossupressão comparável aos dos transplantes de órgão sólido ¹.

3.2. Imunologia de transplantes

CARREL & GUTHRIE (1906) realizaram o primeiro transplante alógeno de membro em cão. No entanto, houve perda do mesmo no oitavo dia após o transplante devido a infecção local ³⁰.

GORER, LOUITT e MICKLEM (1961) relataram experimentos de transplante de tecidos entre indivíduos geneticamente incompatíveis realizados por GORER em 1937, quando descreveu as moléculas de HLA. Estas moléculas são geneticamente codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e geram um polimorfismo que faz cada indivíduo único. Ao mesmo tempo em que é uma grande vantagem na defesa contra patógenos, não somente como indivíduos, mas também como espécie, este polimorfismo é deletério para o sucesso em transplantes ³¹.

OWEN (1970) relatou sua demonstração de que bezerros gêmeos eram quimeras hematopoiéticas em 1945. Ele deduziu corretamente que a troca precoce de sangue (a placenta de bezerros gêmeos quase que invariavelmente têm conexões vasculares em comum) resultou em aceitação mútua e permanente de células hematopoiéticas provenientes de cada gêmeo em transfusões recíprocas ³².

BILLINGHAM e REYNOLDS (1952) descobriram que a maioria dos bezerros gêmeos ao nascimento e por longo tempo após o nascimento, são totalmente tolerantes a enxertos de pele transplantados entre si ³³.

BILLINGHAM, BRENT e MEDAWAR et al (1953) demonstraram que a pré-inoculação de células linfóides provenientes de camundongo doador adulto alógeno em camundongos em período neonatal levou à aceitação permanente de enxertos de pele³⁴.

CABALLERO et al em 2006 realizaram importante revisão sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na rejeição de transplantes. Relembrem conceitos importantes da imunologia de transplantes: ao se transplantar um órgão, as moléculas polimórficas HLA derivadas de doadores são reconhecidas como estranhas ao receptor. Este fenômeno é chamado de aloreconhecimento. Os autores enfatizaram que há muito tempo havia sido observado que os aloantígenos MHC de doadores podem ser apresentados ao sistema imune do receptor através de várias vias. Além do que, a forma pela qual o Ag é apresentado parece estar relacionada ao tipo de rejeição que ocorre. Isto enfatiza a importância de estudar as vias de apresentação de Ag. Na via direta, as moléculas intactas de MHC classe I ou II, presentes na superfície da CAA do doador são reconhecidas diretamente pelas células T CD8 e CD4 receptoras, respectivamente. Na via indireta, moléculas MHC classe I e II do doador são fagocitadas e apresentadas no contexto das moléculas de MHC do receptor para as células T CD8 e CD4 do receptor, respectivamente. O repertório de células T contém uma frequência alta de células T aloreativas à via direta de apresentação e relativamente baixa frequência de células T aloreativas à via indireta. Isto sugere que a via direta de aloreconhecimento é responsável pelos episódios de rejeição precoces, enquanto que a via de aloreconhecimento indireta é responsável pelos eventos mais tardios. Isto está de acordo com a noção de que as CAA no órgão transplantado desaparecem progressivamente com o tempo, tornando a via direta progressivamente inoperante. Ao contrário, a aquisição, processamento e apresentação das moléculas de MHC do doador é um processo mais demorado, que é mais eficaz durante os estágios finais após o transplante.

Uma terceira via tem sido proposta, a via semi-direta. Esta pode servir para ligar as duas vias já citadas. Nesta via, as células dendríticas de receptor (CD) podem adquirir as moléculas MHC das células do órgão transplantado e realizar a apresentação direta para as

células T dos receptores. Há crescente evidência de que as células T CD4 e CD8 com especificidade para ambas as vias direta e indireta podem contribuir para a rejeição do órgão enquanto que as células CD4+CD25+ T reguladoras com especificidade para a via direta tem um importante papel na tolerância em transplantes ³⁵.

3.3. Diferentes antigenicidades dos tecidos

LEE WP et al (1991) realizaram estudo, em que os diferentes tecidos da pata de rato individualmente (pele, tecido subcutâneo, músculo, osso, vasos sanguíneos) e uma pata inteira foram transplantados através de uma forte barreira de histocompatibilidade. As respostas mediadas por células e as repostas imune humorais geradas pelos receptores foram determinadas por culturas mistas de linfócitos e comparadas. Os vários componentes de tecidos interagiram com o sistema imune do hospedeiro de uma forma previsível com tempos e intensidade diferentes. Surpreendentemente, a pata inteira causou menos resposta imune do que os aloenxertos de seus componentes individualmente. Os autores também compararam o grau de resposta imunológica causada por transplantes de tecidos alógenos vascularizados e não vascularizados. Puderam observar que a vascularização primária do tecido transplantado alterou significativamente o padrão de resposta imunológica. Quando e tecidos como pele e osso vascularizados foram transplantados separadamente, os autores constataram altos níveis de respostas humorais na 1ª e 2ª semanas após o transplante, enquanto o transplante de tecido cutâneo ou ósseo não vascularizado não causou resposta significativa até a 2ª semana. Este achado sugere que a vascularização afeta o modo pelo qual os Ags são apresentados, alterando o mecanismo de rejeição do aloenxerto ¹³.

BUTTEMEYER R et al (1996) realizaram 114 transplantes de pata de rato entre ratos com total discordância de complexo principal de histocompatibilidade (doador ACI (RT1a) e receptor Lewis (RT1l)). O regime imunossupressor constituiu-se de várias dosagens de FK-506 e ciclosporina. Baseados em 330 biópsias obtidas de 64 animais, os autores

desenvolveram uma nova classificação histológica de rejeição dos tecidos componentes da pata (pele, músculo, osso e cartilagem). Constataram também que os tecidos do retalho composto alógeno (pata traseira) foram rejeitados em diferentes períodos de tempo. Isto provavelmente reflete a hierarquia de antigenicidade, com a pele sendo o tecido mais antigênico, seguido do músculo, osso e cartilagem ³⁶.

TUNG, MOHANAKUMAR e MACKINNON (2005) realizaram estudo com dois propósitos: definir o padrão de secreção de citocinas durante a rejeição de patas traseiras alógenas em camundongos e determinar a correlação entre o padrão de secreção e as diferentes antigenicidades dos componentes do retalho de pata traseira. Cada camundongo receptor recebeu um tipo de tecido vascularizado (pele, músculo, pata inteira ou pata inteira sem pele) do retalho de pata traseira. Os resultados mostraram que a maior resposta Th1 foi constatada em camundongos receptores de retalhos cutâneos, seguidos de pata inteira, nervo, pata sem a pele e músculo. Os receptores de retalhos cutâneos tiveram maior índice IFN- γ :IL-4, ou seja, maior desvio para a resposta Th1. Estes dados demonstraram que a pele é um dos principais elementos responsáveis pela antigenicidade da pata traseira, já que quando a pele foi removida, notou-se uma mudança da resposta imunológica para Th2 ³⁷.

3.4. Tratamentos imunossupressores com terapia celular *in vitro* ou em modelos de transplantes alógenos de órgãos

FEILI-HARIRI et al (1999) avaliaram dois tipos de DC derivadas de MO de camundongos não obesos diabéticos (NOD). As DC obtidas através de cultura com GM-CSF e IL-4 expressaram altos níveis de moléculas de MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 e eram estimuladores eficientes de células T da raça receptora. Em contraste, DC derivadas das culturas de GM-CSF apresentaram baixos níveis de moléculas MHC classe II e co-estimulatórias de ativação, apresentaram boa função de fagocitose e apresentação de Ag e estimularam menos as células T. As duas populações de DC migraram para o baço e

pâncreas após injeção endovenosa. A terapia com estas DC preveniu o desenvolvimento de diabetes tipo I nos camundongos. Outras evidências no estudo sugeriram que uma resposta Th2 foi gerada em camundongos tratados com DC. Esta resposta atingiu um nível ótimo quando as DC GM + IL-4 foram usadas ³⁸.

FEILI-HARIRI, FALKNER e MOREL (2002) publicaram estudo, em que investigaram o mecanismo pelo qual as DC cultivadas com GM-CSF- e IL-4 preveniram o desenvolvimento de diabetes nos camundongos pré-diabéticos. A análise histológica do tecido pancreático dos camundongos tratados com CS revelou uma redução na intensidade da insulite comparado ao grupo controle. A análise da resposta da célula T nos camundongos tratados com DC em geral, sugeriu uma mudança em direção a um padrão dominado pela resposta Th2, como determinado pela produção de citocina após estimulação com concavalina A ou anti-TCR. Demonstraram também que as células T CD45RB(lo) CD25+ CD4+ do baço dos camundongos tratados com DC produziram grandes quantidades de citocinas Th2 após estímulo com anti-TCR, sugerindo que estas células foram as responsáveis pela mudança para o padrão Th2. Concluíram que a terapia com DC pode ter corrigido o defeito imunoregulatório dos camundongos NOD, restaurando portanto, o balanço entre as células Th1 patogênicas e as células protetoras Th2 ³⁹.

GARROVILLO et al (2001) mostraram que a administração sistêmica de DC tímicas de receptores (ACI) pulsadas com peptideo 5 classe I de doador (raça WF) 7 dias antes do transplante, combinadas com imunossupressão transitória com soro anti-linfocitário resultou em sobrevida prolongada (>200dias) de enxerto específico de doador, no caso, coração de WF. Este experimento mostrou ser reprodutível em modelo clinicamente relevante utilizando DC mielóides de receptores. Este estudo sugere que a administração endovenosa de DC construídas geneticamente, expressando moléculas MHC de doador, tem o potencial de induzir tolerância em transplantes ⁴⁰.

MORELLI e THOMSON (2003) realizaram uma revisão sobre as DC, resumando o papel das mesmas como sentinelas da resposta imune, induzindo e regulando a

reatividade das células T. As DC têm papel crítico na tolerância central e na manutenção da tolerância periférica no estado normal. Após transplante de órgão ou célula, as DC apresentam Ag às células T pelas vias direta ou indireta de aloreconhecimento. Estas funções das DC podem promover a resposta de rejeição, porém também servem como alvos potenciais para supressão de reatividade aloimune e promoção de indução de tolerância. Outras evidências indicam que as DC podem induzir tolerância específica de células T. Apesar de que os mecanismos ainda não são totalmente compreendidos, a capacidade de induzir células T regulatórias podem ser uma importante propriedade das DC tolerogênicas ou regulatórias ⁴¹. Também relatam o sucesso obtido em esforços para gerar as DC com propriedades tolerogênicas em laboratórios, utilizando citocinas específicas, reagentes imunológicos ou farmacológicos ⁴¹.

PECHE et al (2005) geraram duas populações *in vitro* de DC derivadas de medula óssea com baixas doses de GM-CSF e IL-4. A população não aderente (DC clássica) teve capacidade para estimular as células T alogênicas e puderam ser induzidas à maturação completa utilizando vários estímulos. Em contraste, a população aderente, que mostrou um fenótipo imaturo, foi incapaz de estimular células T e era mais resistente à maturação. Em seus estudos, as DC singênicas aderentes injetadas um dia antes do transplante induziram aumento significativo da sobrevivência de aloenxerto de coração e diminuição de respostas humorais e celulares anti-doador. Estes dados sugeriram que as DC singênicas derivadas de MO podem modular as respostas imunes ²².

TANER et al (2005) mostraram que a manipulação farmacológica é um método eficaz para geração de DC imaturas e de fenótipo estável. Após ter demonstrado que a rapamicina pode inibir a maturação e funções das DC, os autores examinaram o impacto da exposição à Rapa na apresentação de aloantígenos (Ag) pelas DC mielóides. Constataram que DC tratadas com Rapa e pulsadas com lisado alogênico (Rapa-DC) estimularam menos as células T singênicas quando comparadas às DC controle (DC pulsadas com aloAg). A exposição à Rapa não bloqueou a fagocitose de Ag pela DC nem impediu a migração *in vivo*

para as células T esplênicas após transferência adotiva²⁴. Observaram que as células T que estiveram em contato com as DC tratadas com Rapa-DC mostraram menor capacidade de produzir IL-2 e IFN- γ , e foram hiporesponsivas ao teste subsequente tanto pela via direta quanto indireta, em uma maneira Ag-específica. *In vivo*, os autores demonstraram que estas DC-Rapa aumentaram significativamente a sobrevida de um enxerto vascularizado de coração AloAg-específico. Este efeito foi revertido pela administração sistêmica de IL-2, porém aumentado tanto pela infusão repetida das células ou por um período curto de tratamento com FK506 após o transplante. Estes efeitos terapêuticos, atingidos através da abordagem das duas vias mais importantes de aloreconhecimento (direta e indireta), fornecem base para uma estratégia clinicamente aplicável visando à supressão da rejeição de aloenxertos vascularizados²⁴.

TAIEB et al (2007) investigaram a influência de GM-CSF e IL-4 (GM+IL-4); e de Flt3 (FL) no fenótipo e função de DC derivadas de MO de ratos Lewis. Descobriram que as DC geradas com GM+IL-4, apesar da expressão de CD80/CD86, são menos estimulatórias do que as DC induzidas com FL⁴².

As DC GM+IL-4 expressaram altos níveis de moléculas CD11b e baixos níveis de OX62, enquanto as DC tratadas com FL apresentaram baixa expressão de moléculas CD11b e alta expressão de OX62. Após a ativação com ligantes de TLR, as DC GM+IL-4 produziram IL-10 e IL-6, mas não produziram IL-12p70, e foram resistentes à maturação. As DC FL produziram IL-12p70, IFN-alpha/beta, IL-10 e IL-6 e sofreram maturação. Estimulações repetidas de células T com DC GM+IL-4 inibiram a proliferação, a produção de citocinas e induziram apoptose precoce de células T. As células T ativadas com DC-FL produziram grandes quantidades de IFN- γ /IL-10 e exibiram apoptose e necrose tardia de células T. *In vivo*, as DC GM+IL-4 induziram hiporesponsividade aloAg- específica após reestimulação com células T. Estes resultados demonstraram que as DC GM+IL-4 exibem propriedades regulatórias intrínsecas, induzindo morte celular passiva nas células T com potencial para inativação ou regulação de células T aloreativas em transplantes⁴².

3.5. Tratamentos imunossupressores no modelo de transplantes alógenos de pata traseira de rato

DOI (1979) foi um dos pioneiros em transplantes alógenos de membro em ratos. Realizou transplantes de membro dos ratos Wistar para os ratos Fisher 344 e associou azatioprina, prednisona e 6-mercaptopurina. Verificou que a associação de prednisona e azatioprina foi mais eficaz na prevenção do processo de rejeição ⁴³.

BLACK et al (1982) publicaram pela primeira vez dados sobre a sobrevida dos transplantes de membro em ratos associando imunossupressão com ciclosporina. Utilizaram ratos brancos Lewis como receptores e ratos pretos da linhagem híbrida Lewis x Brown Norway como doadores. Após transplante microcirúrgico de membro, eles administraram ciclosporina A subcutânea (25mg/Kg/dia) por 20 dias. O grupo controle teve uma sobrevida média de 18 ± 5 dias, enquanto que os transplantes alógenos tratados com ciclosporina tiveram uma sobrevida média de 101 ± 13 dias ⁴⁴.

HEWITT (1983) examinou a habilidade da ciclosporina em prolongar a sobrevida do transplante alógeno de membro em ratos quando comparada com prévia transfusão sanguínea específica do doador. Utilizou ratos Lewis como receptores e Brown Norway (forte diferença de complexo principal de histocompatibilidade) e os híbridos Lewis x Brown Norway como doadores. Os transplantes alógenos de ratos tratados com 20 dias de ciclosporina apresentaram sobrevida de 165 dias e os dos tratados com uma transfusão prévia não tiveram a sobrevida aumentada quando comparado ao grupo controle. A ciclosporina foi muito superior (10,5 vezes maior) à administração prévia de sangue específico com relação à sobrevida prolongada do transplante alógeno de membro ⁴⁵.

GUZMAN-STEIN e SHONS (1987) utilizaram ratos Lewis como receptores dos membros dos transplantes alógenos e Lewis x Brown Norway como doadores (grupo A, n=10) e mantiveram um grupo autógeno controle (grupo B, n=5). No grupo A administraram ciclosporina 8mg/Kg/dia nos primeiros 20 dias, após os quais, reduziram a

frequencia para duas vezes por semana. Mostraram que a pele é o componente mais problemático, devido à rejeição inicial ⁴⁶.

ISHIGURO (1989) utilizou ratos machos Fisher 344 como receptores dos membros e Lewis e WKAH como doadores, associando-se ciclosporina 15mg/Kg/dia via subcutânea por 21 dias. Ele observou que a sobrevida a longo prazo é possível, mas a pele foi rejeitada após cessar a administração da ciclosporina. Imagina-se que o processo de rejeição ocorra pela destruição das células epiteliais, linfócitos T não auxiliares e pelas lesões do endotélio microvascular da derme. O mecanismo da lesão microvascular ainda permanecia desconhecido ⁴⁷.

FERREIRA, ANDREWS e LAREDO FILHO (1995)a apresentaram um estudo em que utilizaram doses subterapêuticas ao longo do estudo de Csa (1.5 mg/kg/d) e RS-61443 (15 mg/kg/d), com o propósito de prevenir rejeição aguda em transplantes alógenos de patas de ratos entre a raça Brown-Norway (doadora) e Fischer 344 (receptores). Os animais que receberam a terapia combinada apresentaram uma sobrevida do RCA de 96% no 172º dia pós operatório, evidenciando um efeito sinérgico das duas drogas, com diferença estatisticamente significativa quando comparada à monoterapia ⁴⁸.

FERREIRA et al (1995)b realizaram estudo com o propósito de analisar as complicações pós-transplante alógeno de retalhos compostos (pata de rato), através de forte diferença do complexo maior de histocompatibilidade. Utilizaram 39 ratos Brown-Norway como doadores e 78 Fisher 344 como receptores. Os receptores foram tratados com CsA e RS-61443 após o transplante. Como resultados, observaram que um RCA (1/78: 1.28%) foi eliminado devido a trombose; dois (2/78: 2.56%) devido a enterite; um (1/78: 1.28%) devido à autofagia e oito (8/78: 10.42%) por causa desconhecida. Os autores concluíram que dentre as 78 (78/78: 100%) patas de rato transplantadas, 12 (15.5%) ratos morreram ou foram eliminados por complicações pós-operatórias agudas que não eram relacionadas a rejeição, toxicidade do regime imunossupressor ou infecções oportunistas ⁶.

OZER et al (2003) testaram a capacidade do soro anti-linfocitário combinado com a CsA na indução de tolerância a RCA de pata traseira em ratos sem imunossupressão crônica. Para isto, utilizaram a raça Lewis-Brown-Norway (LBN, RT1(1+n)) como doadora e Lewis (LEW, RT1(1)) como receptora, consistindo-se em uma combinação de baixa resposta imunológica em relação à barreira de MHC. Os tratamentos foram com SAL somente (0.4 mL/kg), CsA somente (16 mg/kg, por 21 dias), e a combinação de ambos. O SAL foi administrado 12 horas antes da cirurgia e em três diferentes intervalos (7, 14, e 21 dias). Observaram que o uso do SAL somente não prolongou a sobrevida do RCA. O uso da CsA em monoterapia estendeu a sobrevida em até 23 dias. Já a combinação dos tratamentos resultou em sobrevida indefinida em dois a seis ratos no protocolo de tratamento com duração de 14 dias e em todos os 6 ratos no protocolo de tratamento por 21 dias. Estes seis ratos com sobrevida prolongada do RCA (>420 dias) aceitaram enxertos de pele derivados da raça doadora e rejeitaram os enxertos de uma terceira raça não relacionada (ACI). Animais tolerantes apresentaram um quimerismo doador-específico de 35 a 42% no sangue periférico. Concluíram então que a administração de CsA e ALS por 21 dias induziu tolerância doador-específica nos receptores de pata traseira de ratos ⁴⁹.

NGYEN et al (2007) realizaram experimento *in vivo*, com objetivo de prolongar a sobrevida de retalhos compostos alógenos (pata traseira) em ratos, transplantado através de forte barreira MHC. Para isso, utilizaram DC de receptores, pulsadas com alopeptídeo de doador, administradas seis dias antes do transplante, juntamente com uma dose de soro anti-linfocitário. Grupos controles mostraram sinais de rejeição do retalho composto alógeno dentro de cinco dias após a cirurgia. Animais dos grupos experimentais demonstraram aumento da sobrevida do enxerto com uma média de oito dias e exibiram baixos números de células T doadoras. O uso das DC derivadas de MO em conjunto com imunossupressão transitória tem potencial terapêutico na indução de tolerância específica a Ag de doador em de pata de ratos ⁵⁰.

SACKS, HORIBE e LEE (2007) pesquisaram terapias para prolongar a sobrevida do transplante de patas alógenas em ratos, baseadas em DC derivadas de MO, pulsadas com lisado de baço de doador. Descobriram que estas DC, administradas nos dias 7 e 14 relativo ao transplante, juntamente com CsA 10mg/kg/dia, dias 0-6, i.p e soro anti-linfocitário; dia -4/+1 prolongaram significativamente a sobrevida do grupo tratado em relação ao grupo controle. As células T esplênicas no grupo V exibiram hiporesponsividade ao aloAg de doador em reação mista de linfócitos *ex vivo*. Interessantemente, o componente muscular do retalho composto alógeno de receptores tratados com DC mostraram significativa redução na infiltração de células mononucleares relativas aos grupos controles⁵¹.

3.6. Tratamentos imunossupressores no modelo de transplantes alógenos de pele não vascularizada

ZHAO et al (1988a) transplantaram pele parcial dos ratos Buffalo (doadores) ao dorso dos ratos Lewis (receptores). O tempo de sobrevida médio foi de $9,89 \pm 0,35$ dias. Os ratos tratados com ciclosporina a 2,5 ou 5 mg/Kg/dia via oral a partir do 2º dia do enxerto apresentaram tempo de sobrevida médio de $16 \pm 1,9$ e $13,6 \pm 0,4$ dias. Os níveis de ciclosporina foram de 166 ± 20 e 640 ± 32 ng/ml na época da rejeição, respectivamente. A aplicação tópica de fluocinolona diariamente a partir de 72 horas após a enxertia resultou em tempo de sobrevida médio de $24,1 \pm 3,6$ dias. Quando a aplicação tópica foi associada a ciclosporina 5 mg/Kg/dia via oral, o tempo médio de sobrevida foi além de 100 dias em 4 dos 7 animais. Quando a aplicação tópica de fluocinolona foi associada à aplicação tópica de ciclosporina e administração oral de 2,5 mg/Kg, o tempo médio de sobrevida foi de até 50 dias em 4 dos 6 animais. O efeito sinérgico da ciclosporina e fluocinolona permitiu a utilização de doses subterapêuticas de cada medicação⁵².

ZHAO et al (1988b) transplantaram a pele dos ratos Buffalo e ACI para os ratos Lewis (grande discordância de complexo principal de histocompatibilidade). A sobrevida

média do transplante foi de $9,89 \pm 0,35$ dias no grupo controle. Quando associaram ciclosporina oral (2,5 ou 5 mg/Kg/dia) a sobrevida foi para 16 e 13,6 dias, respectivamente. Quando a fluocinolona foi aplicada topicamente, a sobrevida média foi de 24,1 dias. Quando aplicado a combinação de fluorocinolona tópica com ciclosporina via oral, 4 de 7 enxertos sobreviveram indefinidamente (100 dias). Concluíram que o efeito sinérgico da ciclosporina e da fluocinolona tópica pode aumentar a sobrevida do enxerto alógeno de pele de forma segura⁵³.

ENOSAWA e HIRASAWA (1989) realizaram enxertos alógenos de pele entre ratos AO e DA, associando-se ciclosporina 15 mg/Kg/dia por 14 dias. Os enxertos de pele autógenos sobreviveram indefinidamente, enquanto os alógenos sem tratamento imunossupressor foram rejeitados em 7 dias. Com ciclosporina intramuscular, a sobrevida foi de $38,8 \pm 20,5$ dias para os machos e $44,7 \pm 43,3$ dias para as fêmeas. A rejeição ocorreu em média $10,9 \pm 1,6$ dias. O nível sérico de ciclosporina nas fêmeas receptoras foi menor do que o dos machos no 14º dia. Entretanto, mesmo quando o nível era ajustado ao dos machos administrando o dobro da dose (30 mg/Kg/dia), as fêmeas receptoras rejeitaram a pele (sobrevida média de $14,5 \pm 1,9$ dias). Receptores DA machos e jovens de 5 a 10 semanas, rejeitaram a pele em menor período de tempo. Quando ratos mais velhos de 14 semanas foram usados, foi observada sobrevida máxima do enxerto. Portanto, estes resultados indicam que o efeito imunossupressor depende do sexo e idade dos animais⁵⁴.

LEE LEE et al, também citaram a indução de quimerismo misto com um dos conceitos mais promissores para a indução de tolerância clínica. No entanto ressaltaram que a ainda é imprescindível superar a toxicidade decorrente do condicionamento do receptor, necessário para a terapia celular com medula óssea. Portanto, os autores estudaram a efetividade da megadose de células de MO com os Ac monoclonais anti-CD45RB e anti-CD154 mAb em receptores murinos sem condicionamento prévio. Os camundongos B6, receptores de enxertos de pele de BALB/c receberam um condicionamento normal (irradiação) e a dose ótima de TMO (2×10^7 células). Já o grupo experimental não recebeu

condicionamento, mas recebeu uma megadose de TMO (2×10^8 células). Então os receptores foram tratados com anticorpos anti-CD45RB e anti-CD154 (separadamente ou em combinação). Os resultados mostraram que os receptores da megadose sem o condicionamento atingiram um quimerismo de 23.7%, sendo que tolerância foi induzida em 91% dos camundongos que receberam enxertos de pele não vascularizados¹⁸.

ROELEN DAVE et al (2003) publicaram estudo sobre DC amadurecidas de forma alternativa, com hormônios corticóides. Os autores advogam o uso destas DC devido ao risco das DC imaturas preparadas *in vitro* amadurecerem *in vivo*, ao serem expostas a estímulos inflamatórios ou células T CD4. Como resultado, estes tratamentos com DC imaturas podem resultar em estimulação ao invés de supressão do sistema imune do receptor. Os autores já haviam demonstrado previamente que o tratamento *in vitro* de DC imaturas com um fator estimulatório em combinação com dexametasona resulta em maturação de DC através de uma via alternativa, tornando as DC capazes de induzir a hiporesposividade do tipo Th1 de resposta *in vitro*. Esta forma de ativação das DC é irreversível, e as DC são fixadas em seu estado tolerogênico. Neste estudo *in vivo*, as DC foram utilizadas na supressão específica da resposta Th1 aloreativa, resultando em atraso na rejeição de enxerto de pele transplantado através de incompatibilidade completa de barreira MHC em camundongos⁵⁵.

3.7. Tratamentos imunossupressores no modelo de transplantes alógenos de retalhos cutâneos

SOBRADO et al (1990) utilizaram ratos Brown Norway como doadores e Lewis como receptores (raças com grande diferença de complexo principal de histocompatibilidade entre si). Foram constituídos 9 grupos: 1) enxertos de pele; 2) retalhos cutâneos; 3) transplante cutâneo e transplante alógeno de aorta tardio; 4) enxerto de pele + CsA 8mg/Kg/dia via oral; 5) retalhos cutâneos + CsA 8mg/Kg/dia via oral 6) transplante

cutâneo e transplante alógeno de aorta tardio +CsA 8mg/Kg/dia via oral; 7) aorta + ciclosporina + CsA 8mg/Kg/dia via oral; 8) transplante de músculo + CsA 8mg/Kg/dia via oral; 9) transplante de ósseo + CsA 8mg/Kg/dia via oral. Todos os ratos dos grupos 1, 2 e 3, (sem CsA) rejeitaram os tecidos transplantados em 8,5 a 9,4 dias. Em contraste, os grupos 4, 5, 6, 7 e 9 apresentaram sobrevida prolongada dos tecidos transplantados; os resultados mostraram que é possível atingir sobrevida prolongada de tecidos moles e de retalhos compostos alógenos, através do uso contínuo de baixas doses de CsA ⁵⁶.

LIM E LI (1991) realizaram estudo investigando a indução de tolerância a RCuA (retalho epigástrico) entre raças de ratos com menor diferença no MHC (ratos Agouti (DA) e Piebald Virol Glaxo (PVG)). O grupo experimental recebeu altas doses de ciclosporina A (CsA) (25 mg/kg) por nove semanas. O tempo de sobrevida média dos retalhos do grupo controle foi de 7.6 dias (n=10). Com altas doses de CsA, cinco de 14 animais morreram pela toxicidade da droga durante o tratamento. Dentre os nove sobreviventes, oito apresentaram rejeição aguda irreversível após término do tratamento. O estudo confirmou a dificuldade de indução de tolerância aos RCuA, apesar de uma dose de CsA bem mais elevada do que a necessária para obtenção de tolerância a órgãos sólidos, como coração ¹¹.

HIRASE et al (1993) transplantaram enxertos cutâneos de região epigástrica de ratos Lewis para Brown Norway (através de grande barreira de histocompatibilidade), que haviam sido criopreservados a 196 graus Celsius negativos por três semanas. O processo de rejeição contra a epiderme foi marcadamente diminuído, seguido por uma grande diminuição de antigenicidade da derme, com sobrevida da maior parte do tecido por mais de seis meses. Em um outro grupo, os autores transplantaram retalhos cutâneos epigástricos alógenos que haviam sido submetidos a criopreservação pelo mesmo protocolo, ao invés de enxertos. Associaram tacrolimo a 10mg/Kg logo após a cirurgia e então 3mg/Kg a cada 3 dias, obtendo sobrevida prolongada (maior que 100 dias) do retalho. Devido à hipótese de que o congelamento da pele altera a antigenicidade da derme, concluíram que há um grande

potencial de aplicação clínica para retalhos cutâneos alógenos desepitelizados e previamente criopreservados, associado a imunossupressão farmacológica⁵⁷.

DEMIR, OZMEN et al. (2005) investigaram os efeitos de protocolos monoterápicos com duração de 7 dias constituídos por anticorpo monoclonal anti receptor alfa das células T (alpha-TCRmAb), ciclosporina A (CsA), tacrolimo (FK-506) e a combinação dos mesmos na sobrevivência de RCuA transplantados entre raças de ratos com grande diferença no MHC. Quarenta e dois transplantes de retalhos epigástricos foram realizados entre os doadores ACI (RT1a) e os receptores Lewis (RT1(l)) em sete grupos. Os grupos de transplante isogênico e alogênico controle não receberam tratamento. Os grupos de tratamento receberam um protocolo monoterápico de sete dias de alpha-TCRmAb, CsA, ou FK-506, ou a combinação de alpha-TCRmAb/CsA e alpha-TCRmAb/FK-506. O quimerismo específico ao doador foi avaliado com citometria de fluxo (CF). Os protocolos combinados de alpha-TCRmAb/FK-506 e alpha-TCRmAb/CsA prolongaram significativamente a sobrevivência dos RCuA, comparados aos grupos de monoterapia ($P < 0.005$). A análise de CF revelou quimerismo específico ao doador de 15.82% no dia 7 em ratos do grupo alpha-TCRmAb/CsA e um declínio gradual do quimerismo ao dia 63 após o transplante. A extensão significativa da sobrevivência do RCuA nos grupos de terapia combinada estava diretamente associada com a presença do quimerismo doador específico, com rejeição após a queda dos níveis de quimerismo⁸.

SIEMIONOW et al (2005) realizaram estudo, partindo do princípio de que a indução de tolerância pode ser feita através de transplante de células de medula óssea. Os autores criaram uma nova forma de alotransplante de medula óssea, em que não há necessidade de processamento da medula óssea previamente ao transplante. Realizaram um total de 43 RCuA em nove grupos experimentais entre ratos isogênicos [Lewis para Lewis (LEW)] e alogênicos com baixa discordância na barreira MHC [Lewis-Brown Norway (LBN) para Lewis]. Os ratos foram tratados de acordo com protocolos de 35 dias de alpha-TCRmAb ou CsA. As monoterapias combinadas com o transplante de medula óssea

resultaram em aumento da sobrevida de até 21 dias utilizando CsA e até 10 dias usando o protocolo de α -TCR mAb. O uso combinado de α -TCRmAb e CsA com transplante de medula óssea resultou na extensão da sobrevida por até 65 dias ($P < 0.05$). Este novo método simples de transplante de medula óssea alógena sem o condicionamento do receptor é uma técnica minimamente invasiva promissora com potencial para aplicação clínica direta⁵⁸.

SIEMIONOW et al (2005)^b introduziram um modelo experimental de transplante alógeno hemifacial para estudar estratégias para desenvolvimento de tolerância operacional entre raças de ratos com MHC discordante. Neste estudo, 30 ratos foram distribuídos em cinco grupos: 1) grupo controle isogênico; 2) grupo de rejeição do aloenxerto, sendo que o doador foi da raça LBN e o receptor da raça Lewis (transplante semi-alogênico); 3) grupo controle de rejeição tendo ratos ACI como doadores e Lewis como receptores (forte diferença de complexo principal de histocompatibilidade); 4) ratos receptores de retalhos de LBN foram tratados com CsA, inicialmente a 16 mg/kg/dia, reduzidos a 2 mg/kg/dia. 5) ratos receptores de retalhos de ACI foram tratados com CsA, inicialmente a 16 mg/kg/dia, reduzidos a 2 mg/kg/dia. O grupo isogênico sobreviveu indefinidamente. Todos os retalhos não tratados foram rejeitados em 5 a 8 dias. A sobrevida por período prolongado foi atingida em 100% dos receptores de LBN e ACI. Cento e sessenta dias após o transplante, o quimerismo doador-específico estava presente em receptores de LBN (10.14% CD4/RT1ⁿ, 6.38% CD8/RT1ⁿ, 10.02% CD45RA/RT1ⁿ) e ACI (17.54% CD4/RT1^a, 9.28% CD8/RT1^a). Reações mistas de linfócitos confirmaram tolerância em receptores de retalhos de LBN e moderada reatividade em receptores de aloenxertos de ratos ACI¹².

FEILI-HARIRI et al (2007) testaram protocolos de utilizando células de MO alógenas (do doador) co-infundidas com células tronco mesenquimais (CT) para promover aumento de sobrevida de RCuA em ratos, transplantados através de uma forte barreira MHC. Nestes protocolos, os ratos foram condicionados com irradiação não letal de corpo total, e receberam também SAL e CsA por 21 dias. Os resultados mostraram que houve

significativo atraso no aparecimento de doença de enxerto versus hospedeiro e aumento significativo na sobrevida dos RcuA no grupo tratado com 4 doses de MO e CT, comparado ao grupo que recebeu somente MO. Estes dados sugeriram que a terapia de MO e CT tem propriedades imunossupressoras que prolongam a sobrevida do RcuA e limitam a doença do enxerto versus hospedeiro, apesar de que estes regimes não serem suficientes para promover tolerância ou aceitação prolongada (>100 dias), sugerindo um mecanismo imunológico diferente do que ocorre nos transplantes de pele não vascularizadas⁵⁹.

3.7. Mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tolerância

GRAÇA et al (2002) já sabiam que as células T CD4 reguladoras (Treg) poderiam ser isoladas a partir de baços de animais que desenvolvem tolerância a aloenxertos através de terapias com Ac monoclonais não depletoras. No estudo de 2002, tiveram por objetivo determinar se as Tregs poderiam estar em enxertos de pele alógenos, previamente aceitos pelo camundongo receptor através de regime indutor de tolerância. Para isso, estes enxertos de pele tolerizados foram re-transplantados em receptores depletados de células T. As células T que estavam infiltradas no enxerto migraram para o novo receptor. Estas células T foram isoladas do sangue periférico do novo receptor e foram testadas *in vitro*. Os autores comprovaram que as mesmas possuíam função regulatória, pois estes novos receptores aceitaram novos enxertos de pele, obtidos a partir da mesma raça doadora do primeiro enxerto. Os resultados sugeriram que a supressão da célula T observada durante o processo de rejeição de enxertos é um processo ativo que opera além do tecido secundário, e envolve presença constante das Tregs no local do transplante alógeno aceito pelo receptor¹⁷.

OCHANDO et al (2006)¹⁴ publicaram sofisticado trabalho sobre as DC plasmocitóides, identificando-as como CAA essenciais para induzir tolerância a aloenxertos cardíacos vascularizados. As DC plasmocitóides adquiriram o aloAg no aloenxerto e induziram a geração de células T regulatórias CCR4+CD4+CD25+Foxp3+(Tregs). A

depleção de DC plasmocitóides ou o impedimento da chegada da linfa ao linfonodo inibiram o desenvolvimento das células Tregs periféricas e consequente indução de tolerância. Portanto, os autores mostraram que com o auxílio de protocolos de indução de tolerância, as DC plasmocitóides apresentadoras de aloAg migraram para os linfonodos e mediaram o desenvolvimento das células Tregs aloAg-específicas, induzindo tolerância ao aloenxerto ¹⁴.

Métodos

4. MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram utilizados ratos machos com idade entre 8 a 10 semanas, das linhagens Lewis (LEW, RT1^l, receptores), Wistar-Furth (WF, RT1^u, doadores) e Sprague Dawley (SD, terceira raça não relacionada). Os ratos pesavam entre 200 e 250g e foram adquiridos de Harlan (Indianopolis, IN). Estas raças apresentavam uma completa incompatibilidade de complexo principal de histocompatibilidade. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade de Pittsburgh, no Prédio de Ciências Biomédicas, seguindo os protocolos aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais Institucionais (Institutional Animal Care and Use Committee - IACUC) da Universidade de Pittsburgh.

4.2. Procedimentos

Geração de células dendríticas derivadas de medula óssea da raça doadora

Ratos LEW sofreram entanásia com pentobarbital sódico (100mg/Kg) e a medula óssea (MO) dos fêmurs e tíbias foi extraída de modo estéril e preparada para o cultivo de DC. A população de DC gerada com GM-CSF e IL-4 (DC controle) foi preparada de acordo com protocolos em camundongos e ratos já bem estabelecidos^{38,39,42} (FEILI-HARIRI et al., 1999; FEILI-HARIRI, FALKNER e MOREL, 2002; FEILI-HARIRI et al., 1999; FEILI-HARIRI, FALKNER e MOREL, 2002), com algumas modificações no preparo:

As células de MO foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo que cada poço continha 4 ml de solução com DC na concentração de 1.5×10^6 células/ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco Lab, Grand Island, NY), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2nM de L-glutamina, 0.1mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e 5×10^{-5} de M 2-ME (Gibco Lab). GM-CSF (1ng/ml) e IL-4 (1ng/ml) eram adicionados ao meio de cultura no dia 0. Metade do meio de cultura foi trocada no dia 4, retirando-se metade do meio e repondo-se com meio de cultura contendo GM-CSF (1ng/ml) e IL-4 (1ng/ml). Dependendo do experimento, no dia 7 de cultura as DC controle foram pulsadas com lisado de células de WF (doadores), preparado com esplenócitos lisados pelo método de congelamento/descongelamento²⁴ (TANER et al., 2005).

No dia 8 de cultura, as células foram colhidas e utilizadas em experimentos subseqüentes.

A população de DC gerada com GM-CSF e rapamicina (DC GM+Rapa) foi preparada de acordo com protocolo já bem estabelecido para camundongos²⁴ (TANER et al., 2005) com algumas modificações no preparo.

As células de MO foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo que cada poço continha 4 ml de solução com DC na concentração de 1.5×10^6 cells/ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco Lab, Grand Island, NY), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2nM de L-glutamina, 0.1mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e 5×10^{-5} de M 2-ME (Gibco Lab). Somente GM-CSF (1ng/ml) foi adicionado ao meio de cultura no dia 0. Metade do meio de cultura foi trocada no dia 4, retirando-se metade do meio e repondo-se com meio de cultura contendo GM-CSF (1ng/ml) e rapamicina (10ng/ml). Dependendo do experimento, no dia 7 de cultura as CD GM+Rapa foram pulsadas com lisado de células de WF (doadores), preparado com esplenócitos lisados pelo método de congelamento/descongelamento²⁴ (TANER et al., 2005, vide em Anexos).

No dia 8 de cultura, as células foram colhidas e utilizadas em experimentos subseqüentes.

Análise de citometria de fluxo das DC controle e DC GM+Rapa

As DC ($2 \times 10^5/50\mu\text{l}$) foram marcadas com uma cor ou duas cores para análise por citometria de fluxo, utilizando anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* -FITC) ou ficoeritrina (*phycoerythrin*-PE), anti- CD86, MHC classe II (OX6, RT1B), CD40, CD54 (ICAM-I) and CD11b (Mac1), marcador de macrófago His36 (Serotec, Raleigh, NC), marcador de células T $\gamma\delta$ (CD3), marcador de neutrófilo (RP-1) e CD45RA (OX33, células B), bem como os as imunoglobulinas isotípicas de controle apropriadas, conjugadas com FITC- ou PE- (todos os anticorpos de BDPharmingen, San Jose, CA). As DC foram incubadas com os marcadores por 30 minutos, lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2%. As amostras foram analisadas com um citômetro de fluxo FACscan (Beckmann-Coulter) e programa de computador para análise de resultados FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Análise da produção de citocinas pelas DC ativadas com ligantes dos receptores toll-like

As DC controle e DC GM+Rapa a uma concentração de 1×10^6 céls/ml foram ativadas pelos ligantes do receptor *toll-like-4*, o lipopolisacarídeo (LPS, $10\mu\text{g/ml}$), do receptor *toll-like-3*, a poliribose inosina:citidila (Poli I:C, $20\mu\text{g/ml}$; Sigma) ou do receptor *toll-like-9*, a citosina-poli-guanina (CpG, $4\mu\text{g/ml}$; DNA Synthesis Facility, University of Pittsburgh) em placas com 24 poços por 12, 24 e 36 horas. O sobrenadante foi coletado nestes tempos determinados, e os níveis de IL-10 e IL-6 foram quantificados por ELISA Kit OptEIA (BD Pharmingen), enquanto que os níveis de IL12p70 foram medidos por Biosource kits (Camarillo, CA).

Reação mista de linfócitos

Células T singênicas de receptores Lewis (LEW, $2 \times 10^5/100\mu\text{l}$), obtidas de baço utilizando colunas de nylon (CN) foram colocadas em triplicata em placas de 96 poços, de fundo chato (Costar, Cambridge, MA). Quantidades crescentes de DC controle ou DC GM+Rapa pulsadas ou não pulsadas com aloantígenos, previamente γ -irradiadas (20Cy), foram incubadas com as células T a 37°C em CO_2 a 10%, pulsadas após 72 horas com $1\mu\text{Ci/poço}$ de $[^3\text{H}]$ -timidina por 15 horas adicionais, colhidas e contadas com cintilação β . Os dados foram expressos como a média de contagem por minuto (cpm) ± 1 DP.

Grupos experimentais e protocolos de tratamento

Foram realizados 41 transplantes de RCuA de WF para Lew, que foram divididos em sete grupos. A distribuição entre os grupos foi feita randomicamente, previamente ao início dos procedimentos. Cada grupo continha cinco a sete animais (Quadro I). No grupo controle, os animais não receberam tratamento. Os receptores do grupo CsA receberam ciclosporina (CsA, 10mg/Kg, Novartis, East Hanover, NJ) por via intraperitoneal logo após ao transplante (dia 0) até 20 após o mesmo. No grupo SAL+CsA, os ratos Lew receberam soro anti-linfocitário (SAL) nos dias -4 e +1, em adição à CsA. Os ratos nos grupos +DC controle, +DCp controle e +DCp GM+Rapa receberam SAL e CsA em adição às injeções intravenosas das respectivas DC (5 a 7×10^6 células) nos dias 7 e 14 após o transplante. Finalmente, os animais do grupo +MO receberam SAL nos dias -4, 1 e 5 e células derivadas de MO de doador (150×10^6 células) endovenosamente nos dias 0 e 7.

Quadro 1. Distribuição dos 41 ratos receptores segundo o grupo experimental

Grupo experimental		Número de ratos	CsA ^a	SAL ^b	Injeção de células		
					Dia 0	Dia 7	Dia 14
1	Controle	8	Não	Não	-	-	-
2	CsA	6	Sim	Não	-	-	-
3	SAL+CsA	5	Sim	Sim	-	-	-
4	+DC controle	5	Sim	Sim	-	DC controle ^c	DC controle ^c
5	+DCp controle	5	Sim	Sim	-	DCp controle ^d	DCp controle ^d
6	+MO	6	Sim	Sim ^f	MO de doador ^g	MO de doador ^g	-
7	+DCp GM+Rapa	6	Sim	Sim	-	DCp GM+Rapa ^e	DCp GM+Rapa ^e

(^a) Foi administrada ciclosporina (CsA, 10mg/Kg) intraperitonealmente, do dia 0 a 20, relativos ao transplante.

(^b) Soro anti-linfocitário (SAL, 0.5 ml) foi injetado intraperitonealmente nos dias -4 e 1, relativos ao transplante.

(^c) 7×10^6 DC controle foram injetadas pela veia peniana.

(^d) 7×10^6 DCp controle foram injetadas pela veia peniana.

(^e) 5×10^6 DCp GM+Rapa foram injetadas pela veia peniana.

(^f) SAL foi administrado nos dias -4,1 e 5.

(^g) 150×10^6 células de medula óssea (MO) derivadas da raça doadora Wistar Furth foram injetadas na veia peniana.

Transplante de retalho cutâneo epigástrico alógeno

A indução anestésica dos animais receptores e doador foi realizada com pentobarbital sódico (40mg/Kg) intra-peritoneal no quadrante inferior esquerdo do abdome. Após a indução anestésica, realizou-se tricotomia dos membros inferiores e abdome, sendo o animal fixado a uma plataforma em decúbito dorsal, através de bandas de elástico que eram colocadas ao redor das patas do animal e presas à plataforma. Para a anti-sepsia era utilizada solução de poli-vinil-pirrolidona-iodo (PVPI). O nível anestésico foi monitorizado através de observação clínica de sinais vitais (frequência cardíaca e respiratória), além da avaliação da percepção de dor através do teste de pinçamento de pata (animal respondia com reflexo de flexão de pata se sentisse dor).

Todos os ratos foram previamente identificados e os seus dados (peso, linhagem, data de nascimento, origem) anotados rigorosamente.

Os transplantes de RCuA foram realizados como previamente descrito por Strauch e Murray⁶⁰ (vide Anexo), com modificações na técnica de anastomose microcirúrgia, para melhorar a patência.

A técnica empregada neste estudo foi uma modificação da técnica de Strauch e recebeu o nome de técnica “*flow-through*” simplificada.

Nesta técnica, as marcações e dissecação dos retalhos epigástricos no rato doador foram realizadas conforme a técnica descrita por Strauch. No entanto, a dissecação do pedículo foi realizada de forma diferente: a veia femoral era ligada 2 milímetros (mm) após a origem da veia epigástrica e seccionada distalmente a esta ligadura (Figura 1).

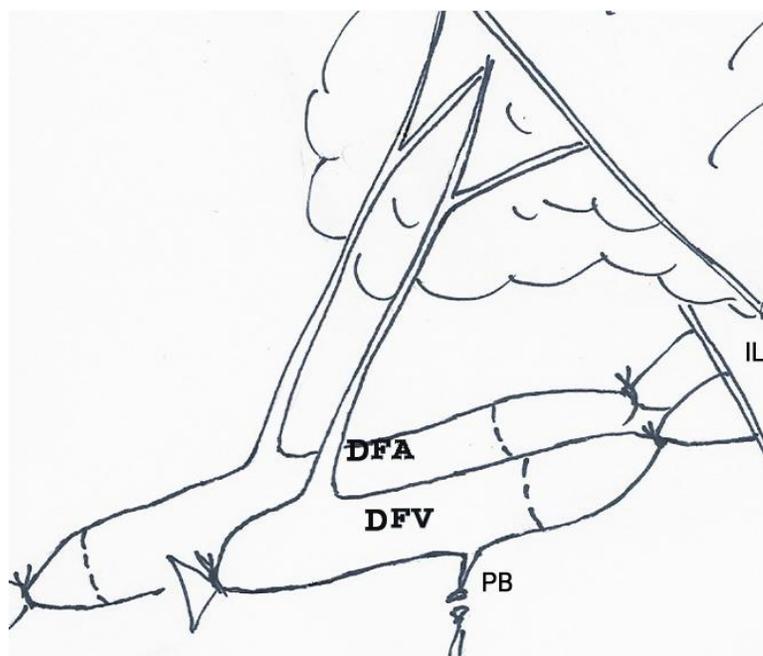


Figura 1: Técnica “*flow-through*” simplificada para o retalho epigástrico de Strauch e Murray. Preparo do pedículo no rato doador. IL: ligamento inguinal, DFA: artéria femoral do doador, DFV: veia femoral do doador, PB: ramo profundo.

A artéria foi seccionada a 0.5cm distalmente à emergência da artéria epigástrica, deixando assim comprimento suficiente para a anastomose distal. A artéria e veia femoral foram seccionadas proximalmente aos seus respectivos ramos profundos (Figura 2). A artéria foi irrigada com 3ml de solução de Ringer lactato a 4° C para drenar o sangue para fora do retalho.

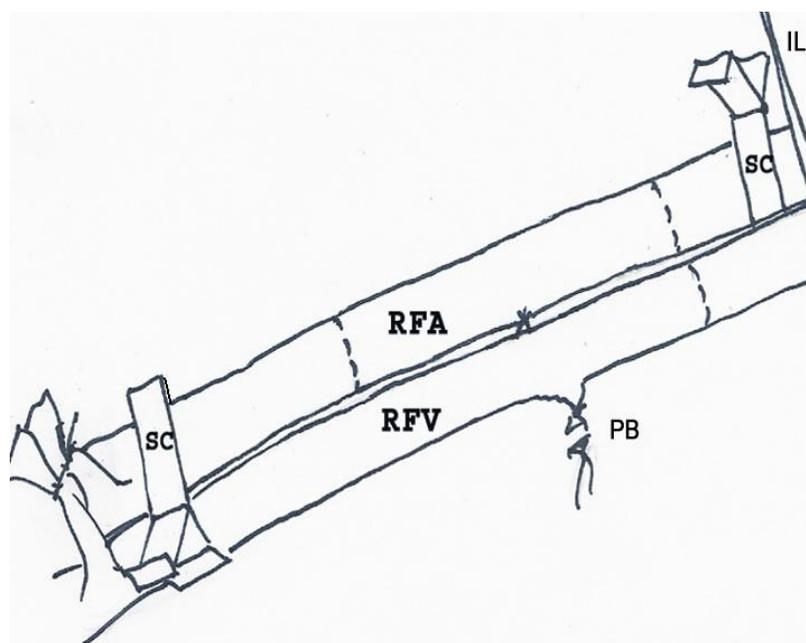


Figura 2: Preparo do pedículo do receptor. IL: ligamento inguinal, RFA: artéria femoral do receptor, RFV: veia femoral do receptor, PB: ramo profundo, SC: *clamp* simples

Nos ratos receptores, os vasos epigástricos foram seccionados e o retalho do receptor foi descartado. Os vasos femorais foram dissecados e seguindo a técnica de Acland ⁶¹, um *clamp* vascular simples foi posicionado na artéria femoral, distalmente ao coto dos vasos epigástricos. Outro *clamp* foi colocado na artéria femoral junto ao ligamento inguinal (Figura 2). Estes *clamps* simples preveniram o influxo arterial enquanto as duas anastomoses arteriais requeridas nesta técnica eram realizadas. O retalho do doador foi então suturado ao leito receptor através de pontos simples de náilon 4-0 nos cantos superiores do retalho à pele do receptor.

Duas anastomoses arteriais foram realizadas, sendo que a primeira foi a que estava localizada à direita do cirurgião e a segunda, a localizada à esquerda, seguindo a técnica de Acland para interposição de enxertos venosos ⁶¹ (ACLAND, 1989).

Um *clamp* ajustável de Acland foi utilizado para aproximar as artérias e veias femorais do doador e do receptor (Figura 3).

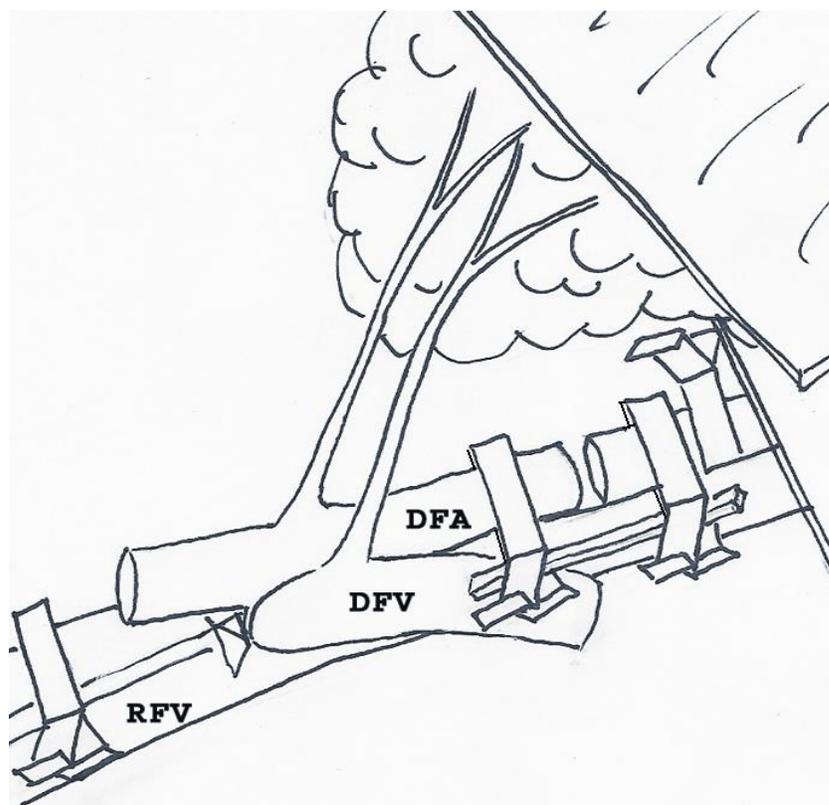


Figura 3: Preparo para realização da 1ª anastomose arterial da região inguinal direita. DFA: artéria femoral do doador, DFV: veia femoral do doador, RFV: veia femoral do receptor.

Os vasos eram dilatados com pinças microcirúrgicas e irrigadas com solução salina heparinizada (100u/ml) e as anastomoses eram completadas com 6-7 pontos simples de náilon 10-0. A segunda anastomose arterial era realizada da mesma maneira. (Figura 4).

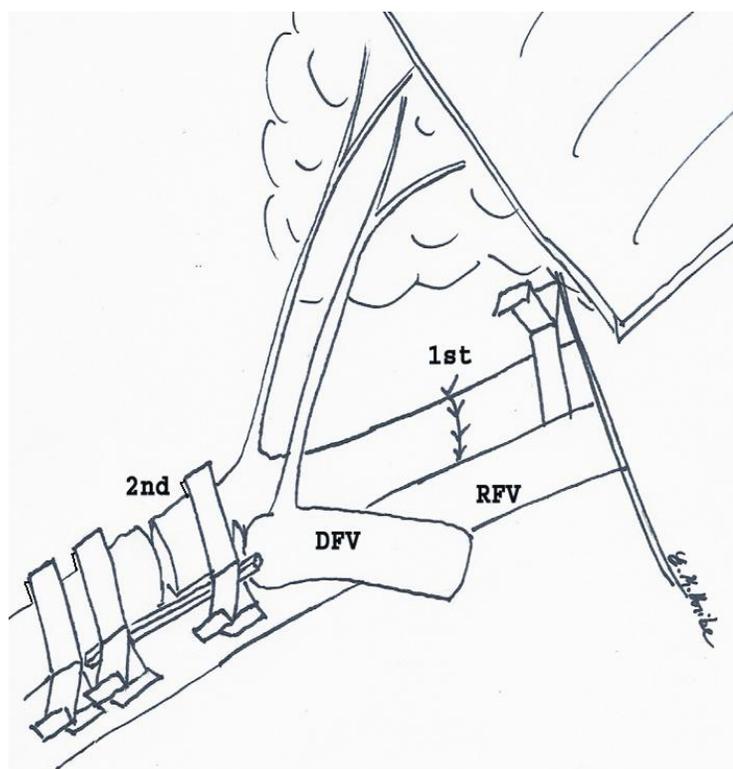


Figura 4. Segunda anastomose arterial no receptor segundo a técnica “*flow-through*” simplificada

Após o término das duas anastomoses, a veia do doador foi anastomosada à veia do receptor sem a retirada dos *clamps* simples arteriais (Figura 5), utilizando 9 a 10 pontos simples com náilon 10-0.

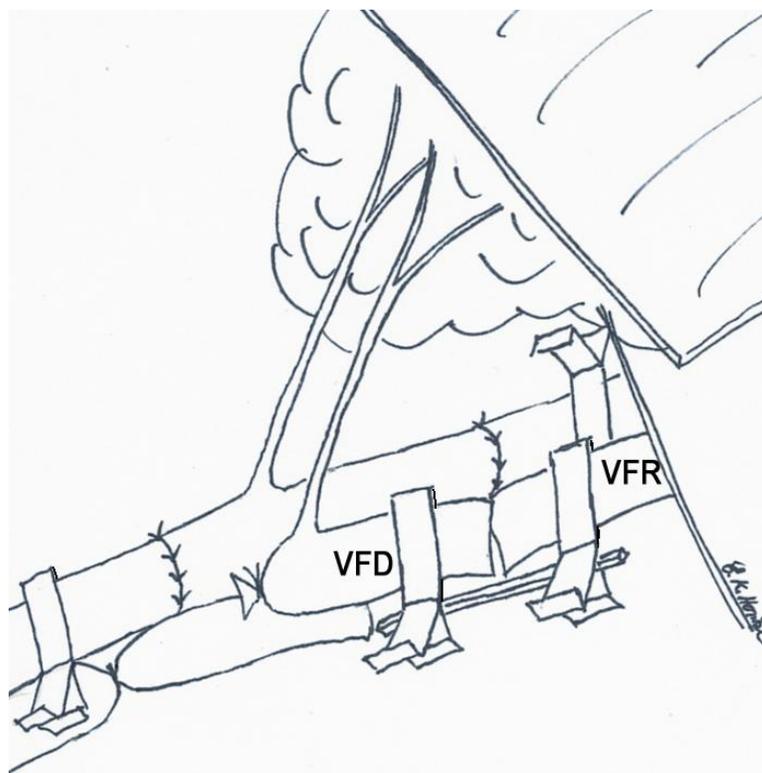


Figura 5. Anastomose venosa no receptor segundo a técnica “*flow-through*” simplificada

Lidocaína a 10% foi colocada nos vasos por dois minutos, e foi retirada através de irrigação com solução fisiológica heparinizada. O *clamp* venoso foi retirado primeiro, seguido pelo *clamp* simples arterial distal e depois o proximal. O aspecto final dos vasos está ilustrado nas figuras 6 e 7. A patência foi avaliada e o retalho foi suturado à pele do leito receptor utilizando pontos simples com náilon 4-0.

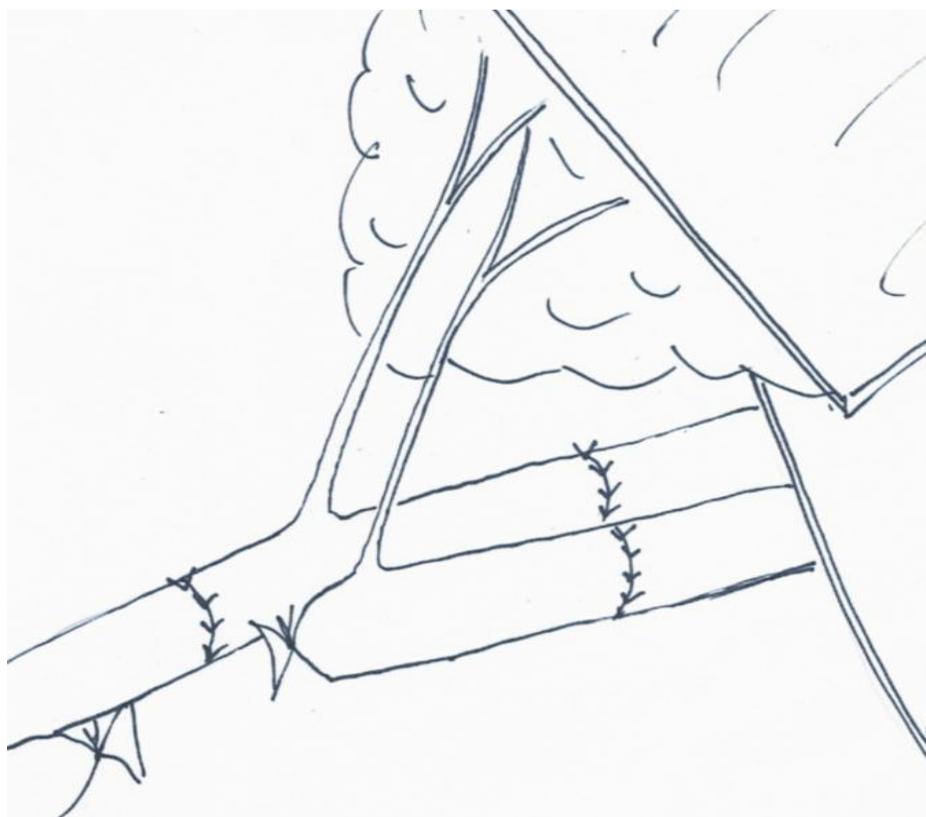


Figura 6: Desenho ilustrando o aspecto final do pedículo do retalho epigástrico preparado com a técnica *“flow-through”* simplificada. Presença de duas anastomoses arteriais e uma venosa.

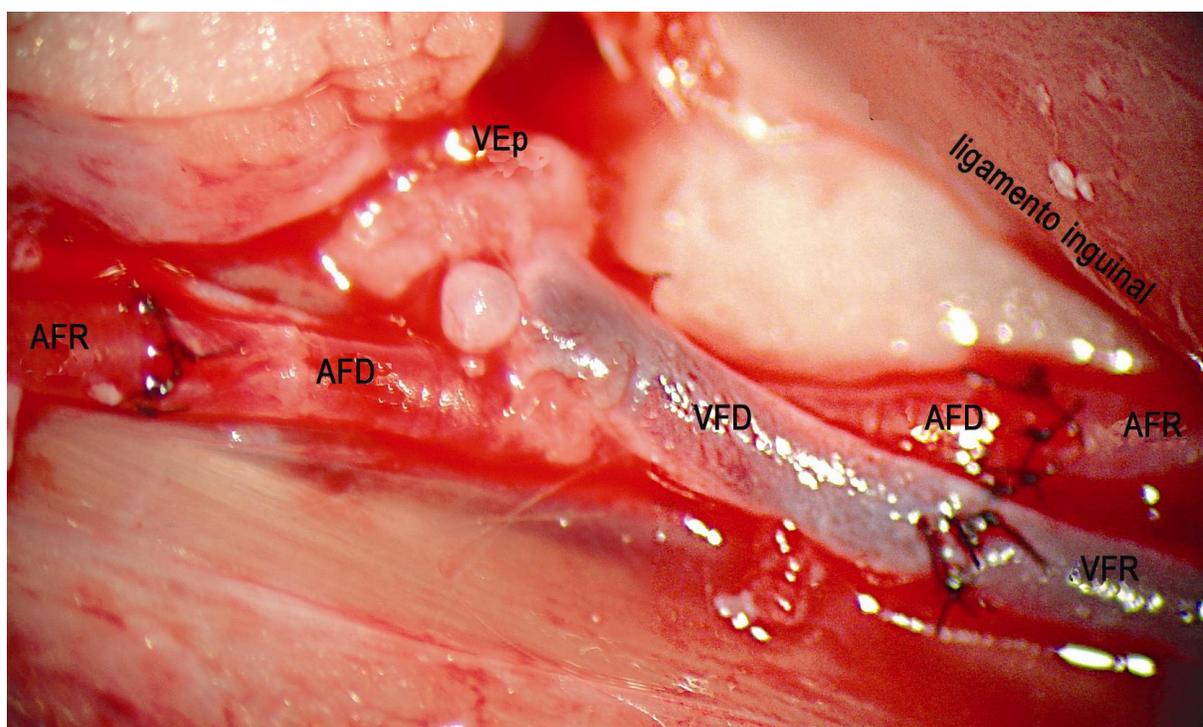


Figura 7: Aspecto final das anastomoses microcirúrgicas empregadas na técnica “*flow-through*” simplificada, visto com aumento de 25x através de microscópio. VFD: veia femoral do doador, VFR: veia femoral do receptor, AFD: artéria femoral do doador, AFR: artéria femoral do receptor, VEp: vasos epigástricos.

Não foram administradas drogas anti-coagulantes ou antibióticos no período peri-operatório. Os animais receberam buprenorfina para analgesia após o procedimento (0.1mg/Kg de 12/12 horas no 1º e 2º dia pós operatório).

Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos sob lâmpadas de aquecimento até recobrem-se da anestesia e poderem deambular.

Avaliação pós-operatória dos retalhos e detecção de quimerismo sistêmico

Os animais foram inspecionados diariamente para avaliar complicações pós-operatórias e sinais clínicos de rejeição. A rejeição de pele foi caracterizada por estudos prévios como sendo um processo que ocorre em uma seqüência reprodutível de eritema,

edema, epidermólise, descamação, exsudação, formação de escara e mumificação⁶². Portanto, o dia da rejeição foi estabelecido quando era observado o primeiro sinal de progressão de epidermólise para descamação. Biópsias de pele do RCuA foram retiradas sob anestesia e técnica asséptica nos dias 21, 50, 100 e 150 após o transplante ou no primeiro dia em que a rejeição era constatada. As peças foram fixadas em formol a 20% e coradas com hematoxilina e eosina pelo laboratório de patologia do Thomas E. Starzl Institute. O sistema de classificação histopatológica de rejeição utilizado foi o descrito por Buttemeyer et al³⁶ (Quadro II).

QUADRO 2– Classificação histológica de Buttemeyer para rejeição cutânea em transplantes de retalhos compostos alógenos.

Grau	Achados histopatológicos
I	Vacuolização de células basais, queratinócitos mortos e infiltrados de células mononucleares na derme superior, frequentemente estendendo-se para a derme e alterações precoces da epiderme.
II	Aumento da vacuolização de células basais, levando à formação de bolhas
III	Necrose da epiderme com graus variáveis de infiltração celular e vasculite

Os ratos que apresentavam rejeição avançada do RCuA sofreram eutanásia com pentobarbital sódico a 100mg/Kg.

No grupo +MO, com o propósito de detectar quimerismo sistêmico, amostras de sangue foram coletadas da veia do rabo no 30° PO e enriquecidas para células mononucleares utilizando-se a separação por Ficoll (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra)⁶³ (BÖYUM, 1968). As células (4×10^5) foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD45.2 (BD Pharmingen), que especificamente detecta células

derivadas de doador WF (raças RT7.2) e analisadas por citometria de fluxo. Neste grupo +MO, os ratos sofriam eutanásia se apresentassem sinais graves de doença do enxerto versus hospedeiro (perda de peso maior do que 20% do peso inicial, sangramento pelas mucosas e pele, diminuição de atividade e fraqueza persistente).

Análise da responsividade das células T dos receptores aos antígenos de doadores

Nos 30°, 50° e 100° PO, as células T foram isoladas de sangue periférico com gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences) e 1×10^6 células foram incubadas com 2×10^6 células apresentadoras de antígenos derivadas de baço de doador ou terceira raça não relacionada, a 37° C em CO₂ a 10% por 4 dias. Células T dos receptores (2×10^6) também foram incubadas por 2 dias em placas com fundo coberto com anticorpo anti-TCR (10µg/ml, BD Pharmingen). Após incubação, os níveis de IL-10 e IFN-γ secretadas nos sobrenadantes pelas células T foram analisadas por ELISA utilizando-se *kits* comerciais.

Enxertia de pele parcial para teste de tolerância nos receptores com sobrevida prolongada

Os receptores com sobrevida prolongada dos RCuA (>100dias), receberam enxertos de pele parcial provenientes de doador (WF) e terceira raça não relacionada (SD) em seu dorso no 150° PO. Para isso, os enxertos com medidas de 2x2 cm eram coletados com técnica asséptica do rabo de ratos WF e SD após a anestesia dos mesmos. Os ratos receptores foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/Kg) e fixados a uma plataforma através de bandas de elástico ao redor das patas. Foi realizada a tricotomia e antissepsia com PVPI nos dois leitos receptores, situados no tórax posterior, um à direita e outro à esquerda da linha média, ambos a 0.5cm do ângulo inferior da escápula e a 0.5cm da espinha dorsal. Por convenção, a pele de raça doadora era enxertada do lado direito e de

raça não relacionada, do lado esquerdo. O curativo oclusivo era realizado em camadas ao redor do tórax, sendo a primeira constituída por rayon, seguida de gazes, faixa crepe e esparadrapo. O curativo foi aberto para inspeção do enxerto após 7 dias, após o que os enxertos foram avaliados diariamente quanto a sinais de rejeição.

Análise histopatológica de pele de RCuA, linfonodos e baço por método de imunofluorescência

Amostras de pele virgem (sem tratamento ou manipulação cirúrgica), de linfonodo do retalho cutâneo epigástrico alógeno, de linfonodo inguinal dos receptores e baço foram coletados dos receptores (n=2) cujos retalhos apresentaram sobrevida prolongada, do grupo DCp GM+Rapa, no 180° PO. Estas amostras também foram coletadas de ratos sem tratamento do grupo controle, cujos retalhos foram rejeitados no 7° PO (n=2) e de ratos não operados, sem tratamento (n=2). Os tecidos foram coletados e congelados em meio OCT – Tissue-Tek (Miles Laboratories, Elkhart, IN). Duas laminas crioseccionadas (10µm) de cada amostra foram fixadas com paraformaldeído a 4%, tratadas com soro de cabra a 5% (v/v) e com o kit para bloqueio de avidina e biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e foram incubadas com anticorpo monoclonal biotinilado anti-Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA) e anticorpo monoclonal purificado camundongo anti- CD4 e CD8 de rato (BD Pharmingen) por 24 horas. Então, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada com Alexa Fluor 564 e anticorpo monoclonal cabra anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (ambos os anticorpos da Invitrogen). O marcador DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) foi usado para corar os núcleos celulares. As laminas foram fixadas com paraformaldeído a 4 % e montadas com glicerol e PBS. Fotografias das lâminas foram tiradas com um microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus) com aumento de 20-40x na lente objetiva; 0-10x de aumento digital. As imagens foram analisadas com os programas de computador MetaMorph Imaging System (Universal Imaging Corporation) e

Adobe Photoshop (Adobe). Para comparar as densidades de células, 2 áreas de cada secção foram escolhidas ao acaso, totalizando 4 áreas por grupo. Estas áreas foram sistematicamente examinadas por um único pesquisador, que não sabia as identificações das lâminas. Foi estudada a porcentagem relativa de células Foxp3+CD4+ / células CD4+, para que a presença das células Foxp3+CD4+ nas diferentes imagens pudesse ser padronizada e as imagens comparadas.

Detecção e quantificação por citometria de fluxo de células Foxp3+CD4+ no baço

Os baços de receptores cujos RCuA apresentaram sobrevida prolongada do grupo DCp GM+Rapa foram coletados no 180° PO, assim como o baços de animais sem tratamento que rejeitaram o baços no 7° PO do transplante e os de animais não transplantados, sem tratamento (n=2 por grupo). Os baços foram processados e células T foram obtidas com filtragem por colunas de nylon. Um milhão de células T foram duplamente coradas com anticorpo anti-Foxp3 conjugado com PE e anti-CD4 conjugado com ficoeritrina-Cy5 (Cy5) e anti-Foxp3 conjugado com Cy5 (eBioscience e BD Pharmingen).

Análise estatística

As amostras e testes foram calculados pelo programa de computador Prism Software for Windows. A média dos grupos e os desvios padrões foram calculados. Teste T de Student não pareado, teste F, teste de ANOVA e a curva de sobrevida de Kaplan-Meier foram empregados para avaliar a as diferenças entre os grupos experimentais em distribuição normal, que foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

Resultados

5. RESULTADOS

As DC GM+Rapa exibem menor expressão de MHC II e de CD40 do que as DC controle

A figura 8A ilustra os histogramas que representam o fenótipo das DC GM+Rapa. A pureza das populações de DC cultivadas in vitro variou de 85 a 88%, resultado baseado na coloração fraca ou ausente de marcadores para His36 (macrófagos), CD3 (células T), CD45R (células B) e RP-1 (granulócitos), combinados com MHC II (Figura 8B). A análise de seis experimentos (ou seja, seis populações de DC GM+Rapa preparadas separadamente) revelou que, tanto as DC controle como as DC GM+Rapa apresentaram expressão de CD11b e de CD54, as DC GM+Rapa expressaram níveis menores de MHC II (* $p < 0.05$) e de CD40 († $p < 0.05$) quando comparadas às DC controle (Figura 9A). Ambas as populações de DC expressaram níveis menores da molécula co-estimulatória CD86 (marcador de maturidade de DC).

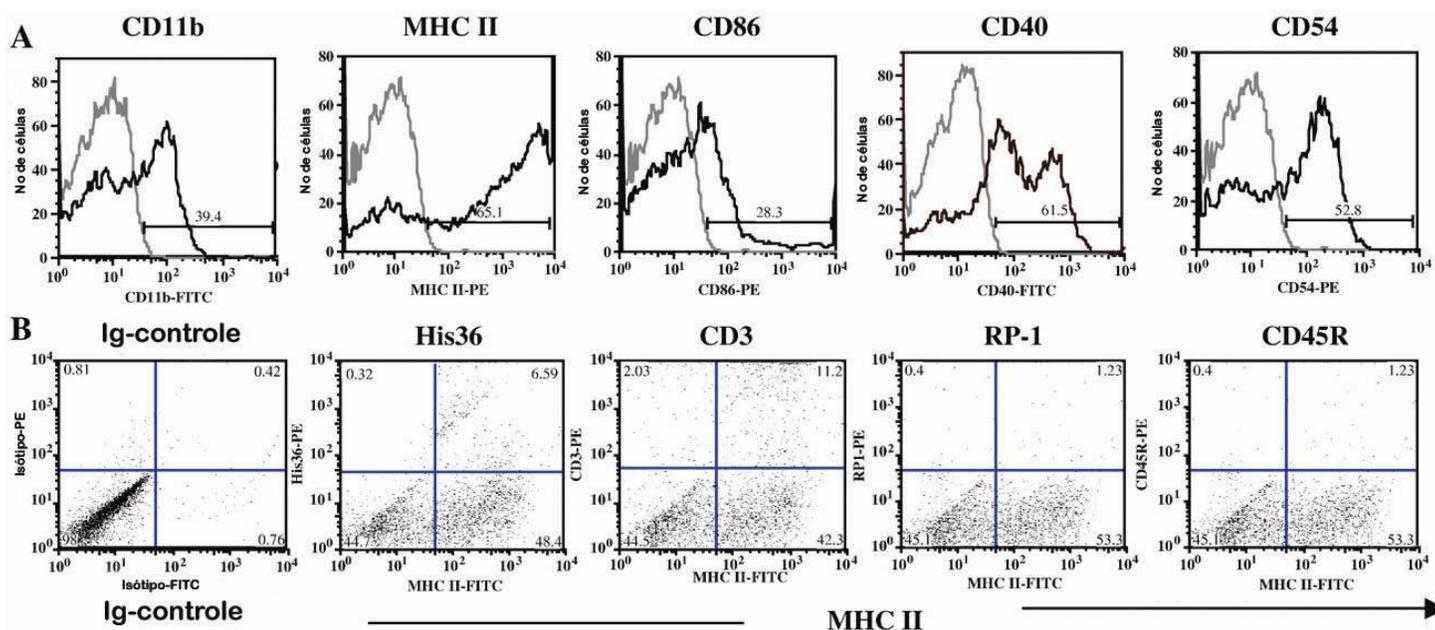


Figura 8. (A) Análise por citometria de fluxo do fenótipo de DC geradas com *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* e rapamicina; (B) Pureza da suspensão celular obtida de cultura de células dendríticas geradas com *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* e rapamicina (85-88%). A análise foi baseada na coloração fraca ou ausente de marcadores para His36 (macrófagos), CD3 (células T), CD45R (células B) e RP-1 (granulócitos), combinados com MHC II. O gráfico é representativo de 3 experimentos.

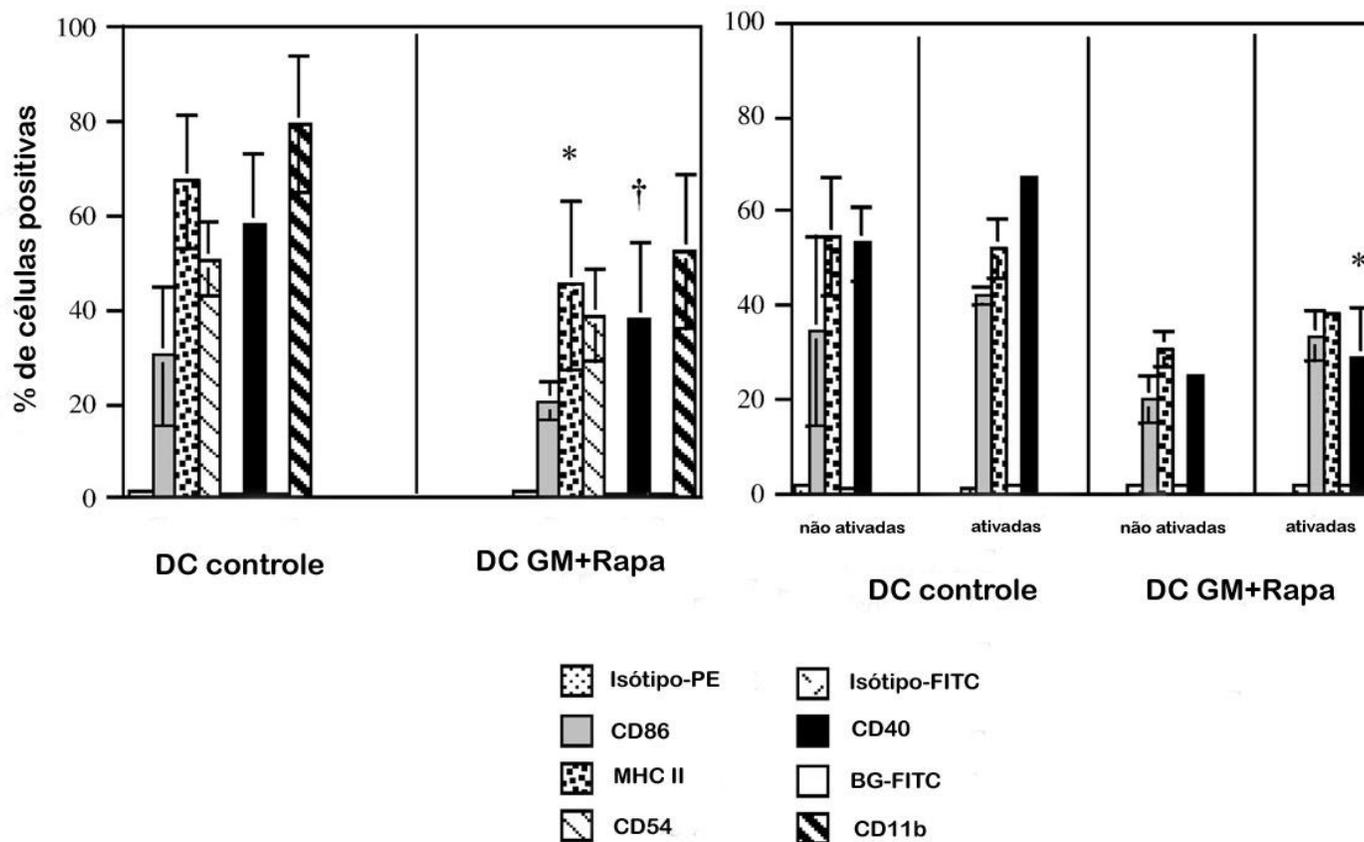


Figura 9. (A) O gráfico à esquerda ilustra a média e desvio padrão das porcentagens de células das DC controle e das DC GM+Rapa (6 experimentos por população) que foram marcadas com os anticorpos indicados acima, analisados com citometria de fluxo. MHC II (* $p < 0,05$) e CD40 († $p < 0,05$), em relação às DC controle. (B) O gráfico à direita mostra a média e desvio padrão das porcentagens de DC das populações controle e GM+Rapa ativadas por 24 horas com LPS (2 experimentos por população) que foram marcadas com os anticorpos indicados acima. CD40 (* $p < 0,05$), em relação às DC controle.

As DC GM+Rapa produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias à ativação com ligantes de TLR e exibem baixa capacidade de estimular as células T in vitro.

Em geral, após a ativação, as DC GM+Rapa expressaram níveis menores de MHC II, CD40 e CD86 quando comparadas às DC controle, apesar de que somente as diferenças dos níveis de expressão da molécula CD40 foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) (Figura 9 B).

Para comparar a produção de citocinas pelas DC controle e pelas DC GM+Rapa, inicialmente analisou-se o padrão de secreção de citocina pelas DC controle. O intervalo de tempo ótimo para comparação entre as populações foi determinado após a análise dos sobrenadantes 12, 24 e 26 horas após o estímulo dos TLR das DC controle. Os dados mostraram que o ritmo de secreção de citocinas (IL-6 e IL-10) não variaram significativamente ao longo do tempo (n=3; dados não ilustrados). Portanto, optou-se por comparar os níveis de citocinas 24 horas após o estímulo inicial. Os dados revelaram que as DC GM+Rapa ativadas com LPS (n=4) produziram níveis de IL-10 (*p=0.001) e de IL-6 (†p<0.05) significativamente menores do que as DC controle (n=3) (Figura 10). Ambas as populações produziram níveis mínimos de IL12p70 (< que 7.8 pg/ml, nível mínimo detectável). Não foi detectada nenhuma citocina em sobrenadantes de DC cultivadas em meio sem substâncias ativadoras de TLR.

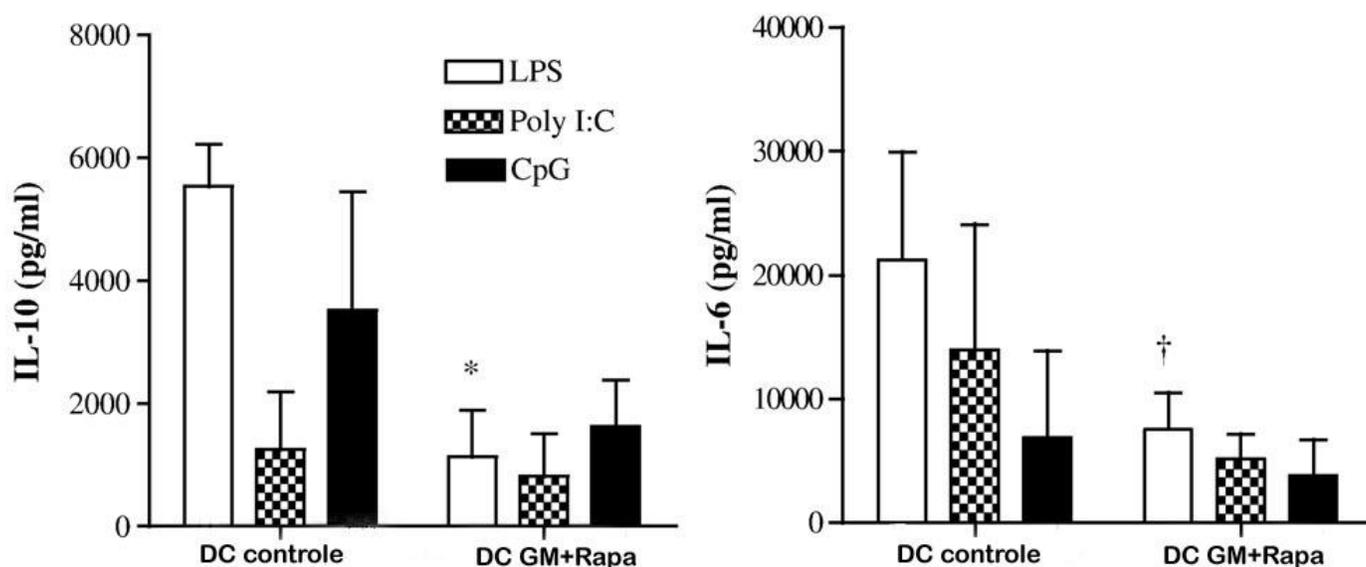


Figura 10. Os gráficos ilustram que as DC GM+Rapa produzem baixos níveis de citocinas pró e anti-inflamatória 24 horas após a estimulação de TLR. Os dados representam as médias e os desvios padrões de 3 experimentos independentes. A diferença foi estatisticamente significativa quando foram comparados os níveis de IL-10 (*p<0.001) e IL-6 (†p<0.05) produzidos pelas populações 24 horas após o estímulo com LPS

Apesar das duas populações exibirem baixa capacidade estimulatória de células T, as DC GM+Rapa evocaram uma resposta proliferativa das células T significativamente menor, quando comparada às DC controle (não pulsadas) (* $p < 0.001$) ou DC controle pulsadas com aloAg (DCp) ($\dagger p < 0,001$) (Figura 11). Pulsos com aloAg não afetaram significativamente o perfil estimulatório das populações de DC.

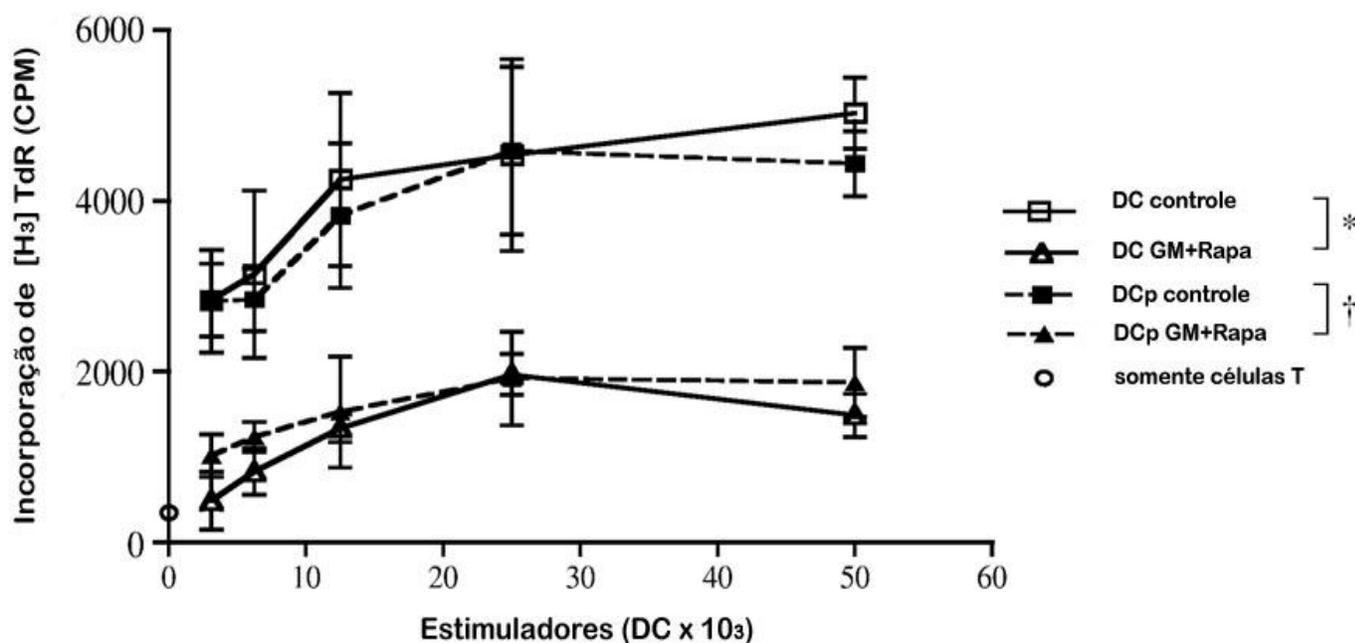


Figura 11. O gráfico ilustra que as DC GM+Rapa exibem menos capacidade para estimular a proliferação de linfócitos T *in vitro*, quando comparadas às DC controle. Os dados representam 3 experimentos. As diferenças das curvas de proliferação de células T estimuladas pelas DC GM+Rapa foram comparadas com as das estimuladas pelas DC controle (* $p < 0.001$). A capacidade estimulatória das DC GM+Rapa pulsadas com Aloag também foram comparadas com a das DC controle pulsadas (DCp controle) e a diferença entre as curvas de proliferação de linfócitos T também foi estatisticamente significante ($\dagger p < 0.001$)

Protocolos de tratamento envolvendo as DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos promovem sobrevida prolongada de retalhos cutâneos alógenos.

Tentativas iniciais de realizar o procedimento de transplante de retalhos cutâneos epigástricos alógenos microcirúrgicos empregando a técnica de Strauch falharam em obter patência de anastomoses, resultando em trombozes de retalhos. As modificações microcirúrgicas desenvolvidas neste estudo possibilitaram patência de 100% dos casos, em contraste com a técnica de Strauch, que resultou em patência em apenas 24% das anastomoses de retalhos realizadas com esta técnica (Quadro 2).

A avaliação pós-operatória mostrou que sem tratamento, os RCuA foram rejeitados dentro de 8 dias (Quadro 1 e 3, figura 12). A monoterapia com CsA por 21 dias levou à rejeição do retalho em 27 a 45 dias. A adição de 2 doses de SAL não alterou significativamente a sobrevida dos retalhos alógenos, quando comparada à sobrevida do grupo que recebeu apenas CsA.

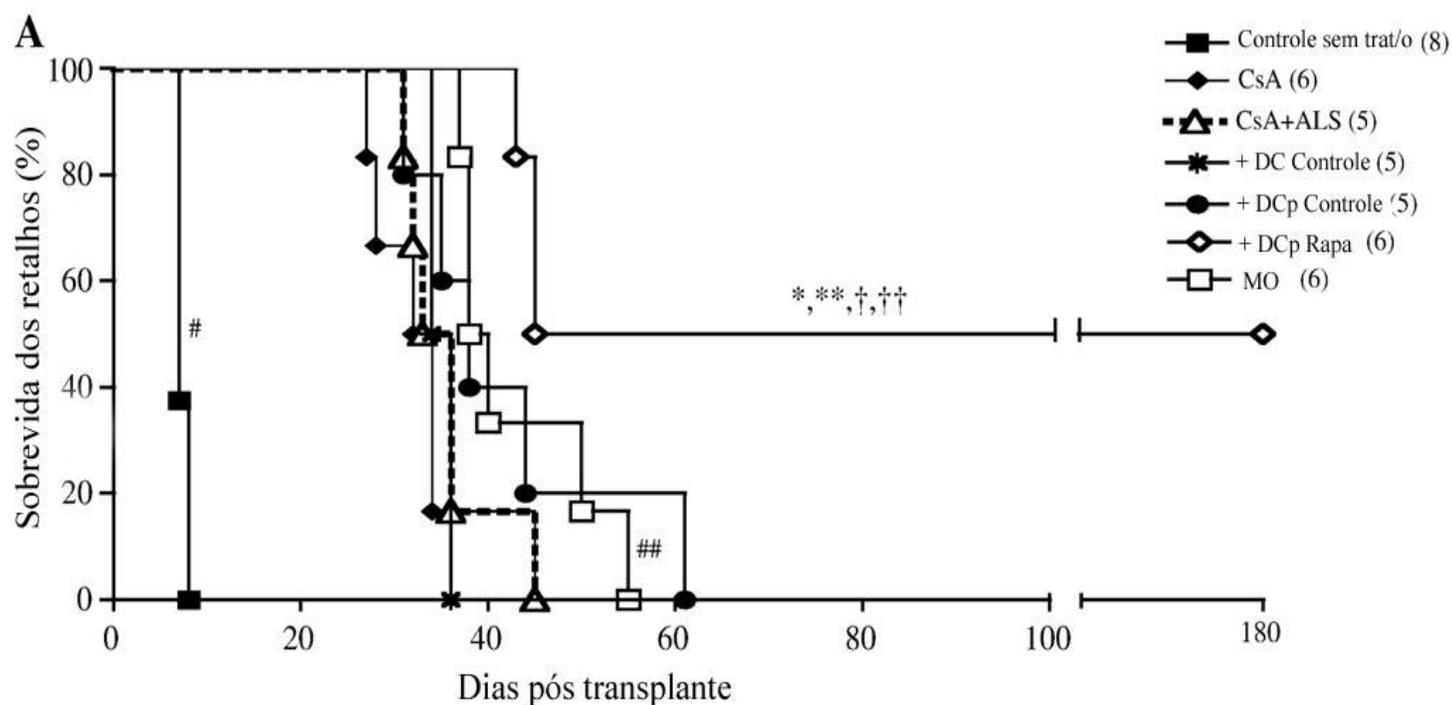


Figura 12. Sobrevida dos retalhos epigástricos cutâneos alógenos microcirúrgicos após emprego dos diferentes protocolos de tratamento. CsA: receptores tratados com ciclosporina (10mg/Kg) intraperitonealmente, do dia 0 a 20, relativos ao transplante. CsA+SAL: receptores tratados como o grupo CsA, além de soro anti-linfocitário (SAL, 0.5 ml) intraperitonealmente nos dias -4 e 1, relativos ao transplante. +DC Controle: receptores tratados como o grupo CsA+SAL, além de 7×10^6 de DC controle, injetadas pela veia peniana. +DCp Controle: receptores tratados como o grupo CsA+SAL, além de 7×10^6 de células dendríticas DCp controle. +MO: receptores tratados como o grupo CsA, além de SAL administrado nos dias -4, 1 e 5 e 150×10^6 células de medula óssea (MO) derivadas da raça doadora Wistar Furth injetadas na veia peniana. +DCp GM+Rapa: receptores tratados como o grupo CsA+SAL, além de 5×10^6 de células dendríticas DCp GM+Rapa injetadas pela veia peniana. O teste estatístico foi o de Log Rank, qui quadrado: grupo controle sem tratamento comparado aos grupos restantes (2-7) (# $p < 0.05$); grupo 6 comparado ao grupo 3 (* $p < 0.01$); grupo 6 comparado ao grupo 4 (** $p < 0.001$); grupo 6 comparado ao grupo 5 († $p < 0.05$); grupo 6 comparado ao grupo 7 (†† $p < 0.05$); grupo 7 comparado ao grupo 4 (## $p < 0.001$).

QUADRO 3. Sobrevida dos retalhos nos grupos com diferentes protocolos.

Grupo	Sobrevida do retalho (dias)	Tempo médio de sobrevida (dias)
1. Controle sem tratamento	7,7,7,7,8,8,8	7#
2. CsA (10mg/Kg, d 0-20)	27,28,32,34,34,45	33
3. ALS (d -4,1) +CsA	32,32,33,36,36	33
4. +DC Controle (d7, 14)	34,34,34,36,36	34
5. +DCp Controle (d7,14)	31,35,38,44,61	38
6. +DCp GM+Rapa (d7,14)	43,45,45,>180,>180, >180	>113*,**,†,††
7. +MO (d 0,7)	37,38,38,40,50,55	39#

O teste estatístico foi o de Log Rank, qui quadrado: grupo controle sem tratamento comparado aos grupos restantes (2-7) (#p<0.05); grupo 6 comparado ao grupo 3 (*p<0.01); grupo 6 comparado ao grupo 4 (**p<0.001); grupo 6 comparado ao grupo 5 (†p<0.05); grupo 6 comparado ao grupo 7 (††p<0.05); grupo 7 comparado ao grupo 4 (##p<0.001).

A complementação da CsA e SAL com 2 doses de DC controle também falhou em prolongar a sobrevida, quando comparada à do grupo CsA+SAL. As DC controle pulsadas com aloantígenos (2 doses) infundidas com CsA e SAL promoveram aumento da sobrevida dos retalhos, quando comparada à do grupo CsA+SAL, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

À administração de duas doses de MO de doador associadas a Csa e SAL, houve aumento significativo da sobrevida do retalho quando comparado ao grupo CsA (p=0.03), CsA+SAL (p=0.03) e +DC controle (p=0.0009). A administração de DC GM+Rapa pulsadas com aloantígeno, combinada com CsA e SAL resultaram em um aumento de sobrevida sem tratamento imunossupressor contínuo inédito na literatura (>180 dias) de 50% dos RCuA deste grupo, que mantiveram arquitetura histológica normal preservada (Figura 11), em contraste com necrose epidérmica e intensa infiltração de células inflamatórias observadas nos retalhos rejeitados. A sobrevida aumentada deste grupo foi estatisticamente significante quando comparada a todos os outros grupos. O teste Log Rank mostrou sobrevida significativamente elevada dos retalhos alógenos do grupo +DCp

GM+Rapa quando comparado a todos os outros grupos ($p=0.0064$ quando o grupo +DCp GM+Rapa foi comparado ao grupo Csa+SAL; $p=0.0009$ comparado ao grupo +DC controle, $p=0.0285$ comparado ao grupo +DCp Controle; $p=0.0418$ comparado ao grupo +MO). A sobrevivência do grupo +MO foi significativamente maior do que a do grupo +DC controle ($p=0.0009$) e do que a do grupo CsA+SAL ($p=0.03$) (Figura 9).

Os receptores do grupo +MO mostraram níveis variados de quimerismo no 30° PO, variando de 2.9 a 64.3% de células T de doador circulantes. Quatro de seis ratos rejeitaram o RCuA 38 a 55 dias após o transplante. Dois ratos apresentaram níveis moderados de quimerismo (27.8 e 38.4%) e morreram de doença do enxerto versus hospedeiro (DEVH) no 37° e 38° PO. A partir destes resultados, não foi observada uma correlação entre os níveis de quimerismo e sobrevivência do RCuA, apesar de que a DEVH ocorreu quando os níveis de quimerismo estavam moderados.

As DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos induzem baixa proliferação de células T periféricas ao estímulo com antígeno doador-específico

À estimulação com CAA de doador no 30° PO, as células mielóides de sangue periférico (CMSP) dos receptores que receberam DC controle (não pulsada) ou MO produziram níveis de IFN- γ e de IL-10 significativamente maiores do que os animais que receberam DC controle pulsada ou DCp GM+Rapa ($p<0.05$) (Figura 13, gráficos da esquerda). No 30° PO, as CMSP do grupo DCp controle produziram IFN- γ e IL-10 quando estimulados com CAA de terceira raça não relacionada, porém mantiveram-se hiporresponsivos às CAA de doador ($p<0.05$; comparado com os grupos +DCp controle e +MO) (Figura 13). Já as CMSP do grupo +DCp GM+Rapa não responderam à estimulação com CAA de raça doadora ou de terceira raça não relacionada (Figura 13). No entanto, quando as CMSP de ratos tratados com DCp GM+Rapa foram estimuladas com CAA de

raça não relacionada, as mesmas produziram níveis de IFN- γ ($p=0.01$) e IL-10 ($p<0.001$) significativamente maiores do que os níveis produzidos no 30° PO; porém estas CMSP permaneceram hiporresponsivas a CAA de raça doadora, demonstrando hiporresponsividade doador-específica (Figura 13).

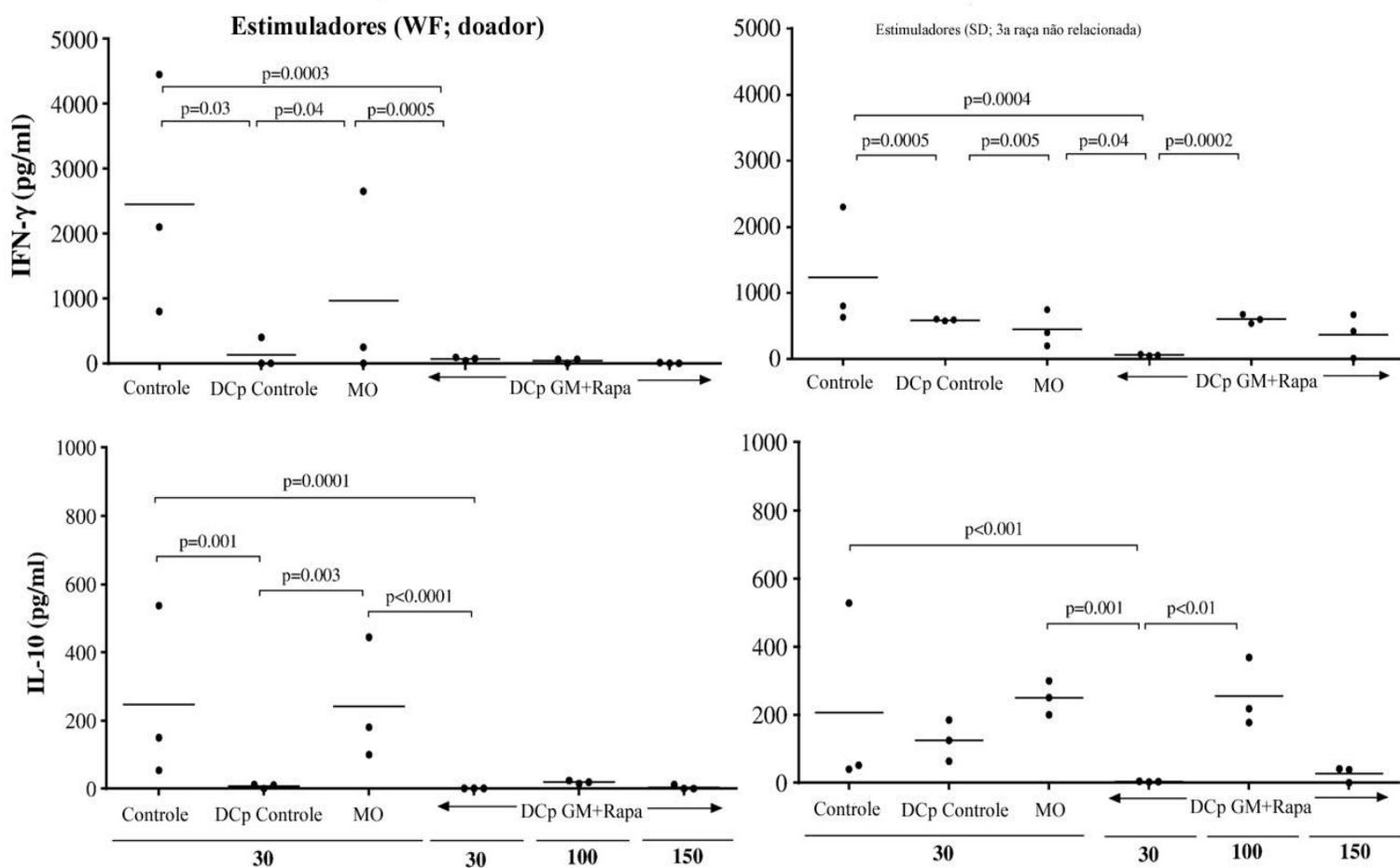


Figura 13. Produção de citocinas pró e anti-inflamatória (IFN- γ e IL-10) pelas células mielóides de sangue periférico (CMSP) de receptores tratados com DC controle, DC controle pulsadas com aloantígenos (DCp Controle), medula óssea (MO) e DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos (DCp GM+Rapa), nos 30°, 100° e 150° dia pós transplante. As DCp GM+Rapa induziram as CMSP dos animais receptores a manterem baixa responsividade doador-específica por período prolongado (>150 dias).

Enxertos de pele derivados de doadores sobreviveram por mais tempo do que os enxertos derivados de terceira raça não relacionada quando transferidos aos animais cujo retalho apresentou sobrevida prolongada no grupo +DCp GM+Rapa

Para testar a tolerância específica a doador in vivo, os ratos com RcuA com sobrevida maior do que 100 dias (n=3) receberam enxertos de pele parcial derivados de raça doadora (WF) e de uma terceira raça não relacionada (SD) no 150° PO. Os enxertos de pele provenientes de doador sobreviveram por mais tempo (n=3; 12 ± 2 dias; $p=0.01$) do que os derivados de uma terceira raça (n=3; média de 7 ± 0 dias), sendo que a observação clínica de rejeição foi confirmada por biópsia (grau III).

Os tecidos linfóides e os retalhos cutâneos alógenos com sobrevida prolongada do grupo +DCp GM+Rapa são intensamente povoados por células T Foxp3+CD4+

A análise histopatológica de tecidos corados por técnica de imunofluorescência para detecção de moléculas CD4 e Foxp3 mostrou células T Foxp3+CD4+ infiltradas nos RCuA tolerizados, mas não em retalhos normais ou rejeitados (Figura 14).

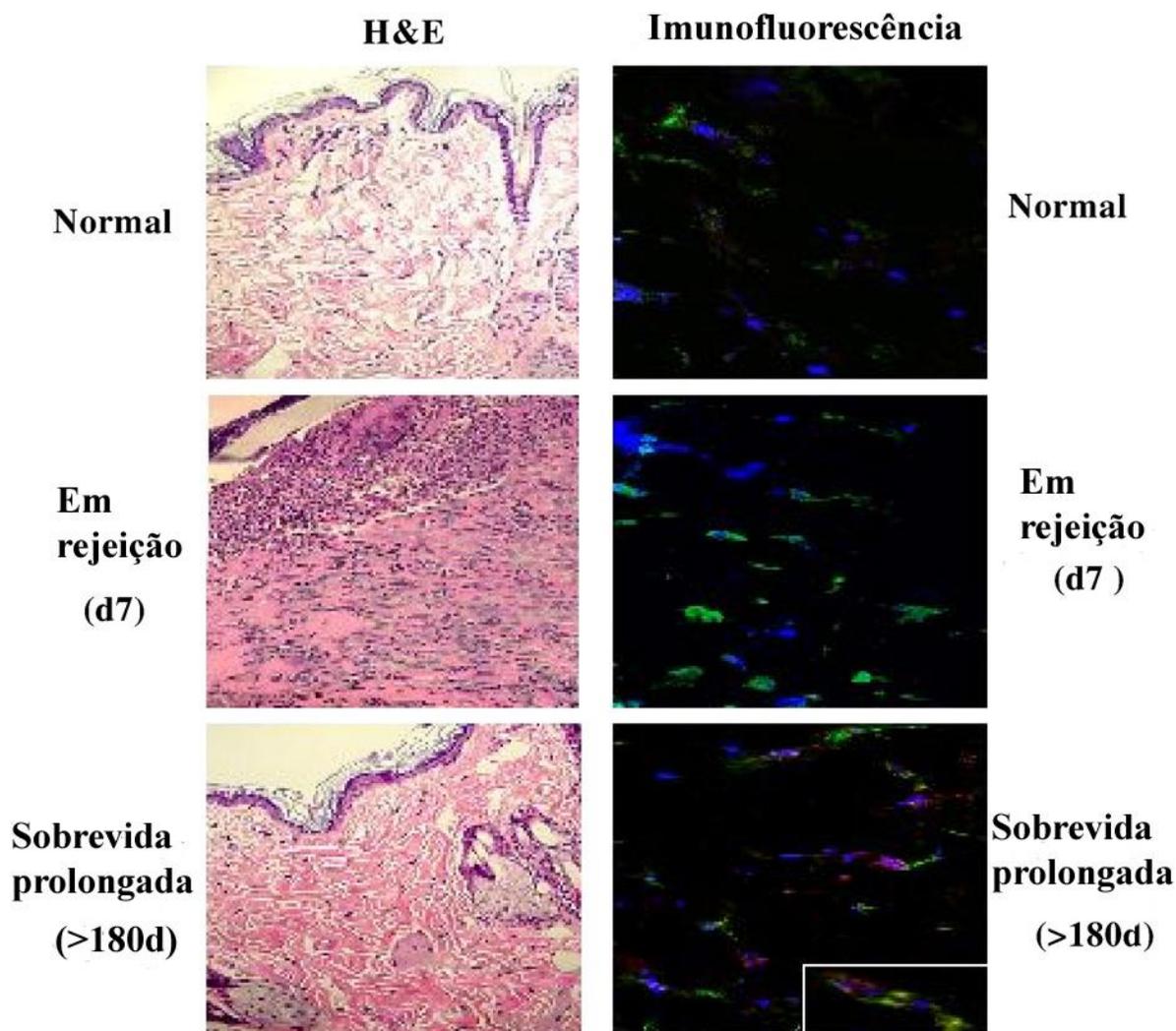


Figura 14. Cortes histológicos ilustrando as camadas da pele de rato de raça receptora sem tratamento, de retalhos epigástricos cutâneos alógenos microcirúrgicos do grupo controle durante a rejeição e do grupo +DCp GM+Rapa no 180º dia após o transplante. As figuras da coluna esquerda são de amostras de pele coradas com hematoxilina e eosina. No 150º PO, os retalhos cutâneos alógenos do grupo +DCp GM+Rapa apresentavam estrutura normal. As figuras da coluna direita foram coradas com técnica de imunofluorescência. As células T Foxp3+(vermelho) CD4+ (verde) (Tregs, em detalhe na figura inferior da coluna direita) estão presentes somente nos retalhos de sobrevida prolongada (>180 dias) do grupo +DCp GM+Rapa. Aumento original x 200 (H&E) e x 400 (IF); n=2 ratos por grupo, 2 seções por rato.

Nos LNs, as células Tregs estavam mais concentradas nas áreas de células T e foram encontradas em quantidades significativamente maiores nos LN de retalhos cutâneos

epigástricos alógenos (LN de drenagem, originário do doador), quando comparados aos LN retirados de retalhos cutâneos epigástricos alógenos rejeitados ($n=2, *p=0.025$) ou LN inguinais de ratos da raça receptora, não manipulados ou operados ($n=2, †p=0.024$). Apesar da frequência das células T CD4+Foxp3+ no LN inguinal contralateral ao retalho ser maior do que no LN retirado de retalhos cutâneos alógenos rejeitados ou de LN controle, estes valores não apresentaram diferença estatisticamente significante (figura 15 e 16).

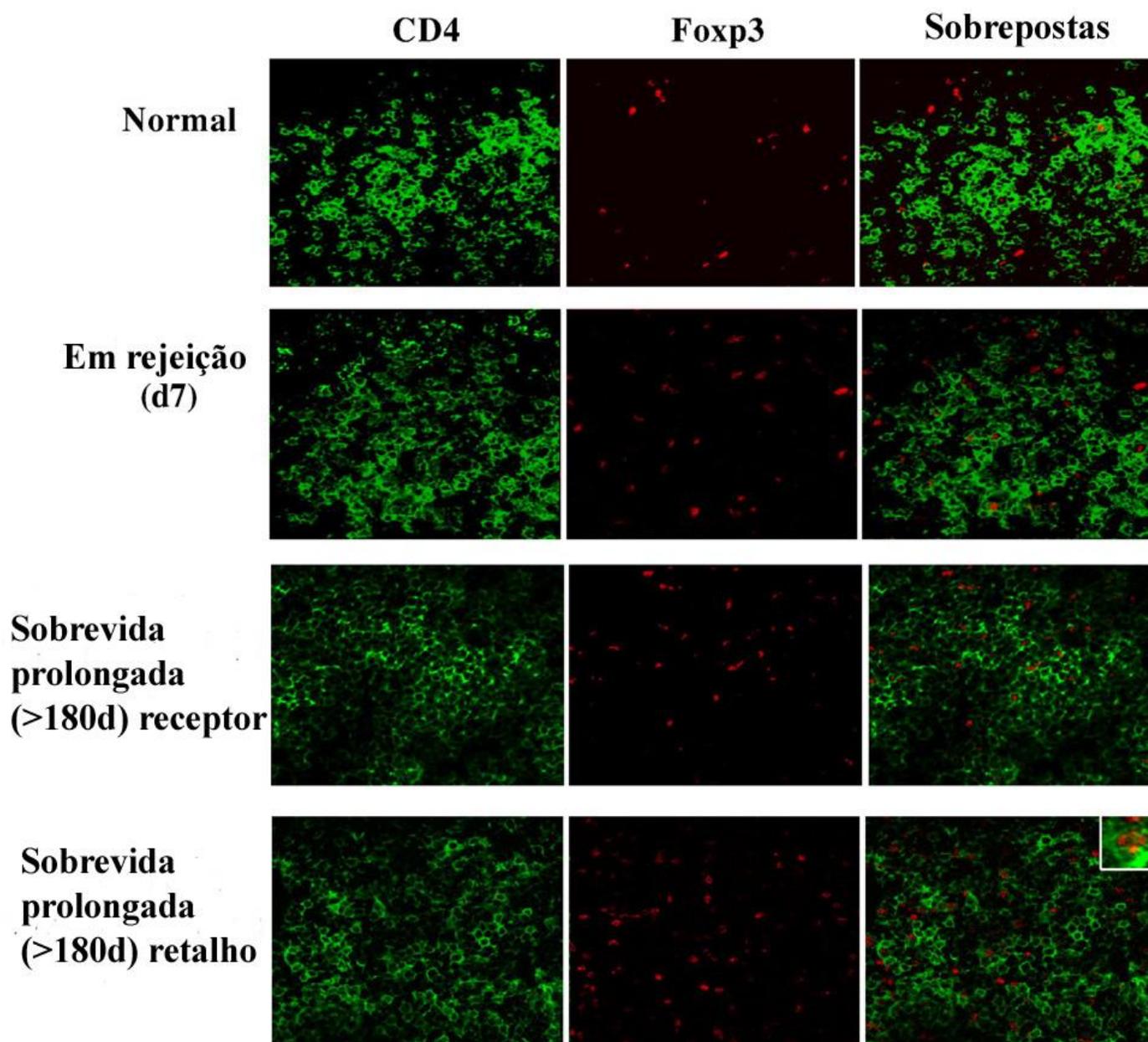


Figura 15. Análise imunofluorescente de células T Foxp3+CD4+ nos linfonodos inguinais. A expressão do marcador é marcadamente mais forte no linfonodo de drenagem dos retalhos com sobrevida prolongada do grupo +DCp GM+Rapa. Aumento original, x 200; n=2 ratos por grupo, 2 seções por rato.

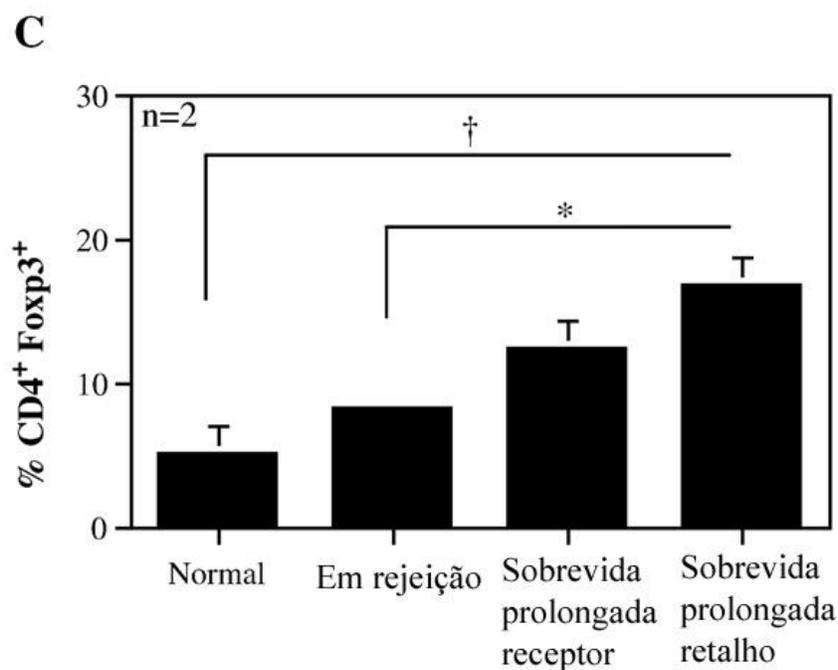


Figura 16. Quantificação de células coradas nas secções de linfonodo tratadas com técnica imunofluorescente. Os dados exibidos representam médias em % \pm desvio padrão de células T CD4⁺Foxp3⁺. A diferença de médias entre linfonodos de retalhos de sobrevida prolongada e linfonodos de retalhos rejeitados foi estatisticamente significativa (* $p=0.025$); bem como a diferença entre os primeiros e linfonodos normais ($\dagger p=0.05$).

Nas lâminas de tecido esplênico, a maioria dos Tregs estavam localizados na bainha linfática periarterial (PALS, área de células T) e os receptores de retalhos com sobrevida prolongada também apresentaram maiores quantidades de Tregs, comparado aos receptores que rejeitaram os retalhos e ratos virgens de procedimentos ou tratamento ($p<0.001$ para ambas as comparações; figuras 17 A, 17 B e 18).

A análise por citometria de fluxo das células T purificadas com colunas de náilon também mostraram uma expressão significativamente maior de Foxp3 em baços de animais tolerizados do que em animais que rejeitaram o retalho ou de ratos virgens de tratamento ou procedimento (*, \dagger , $p<0.05$ para ambos; Figura 17 A).

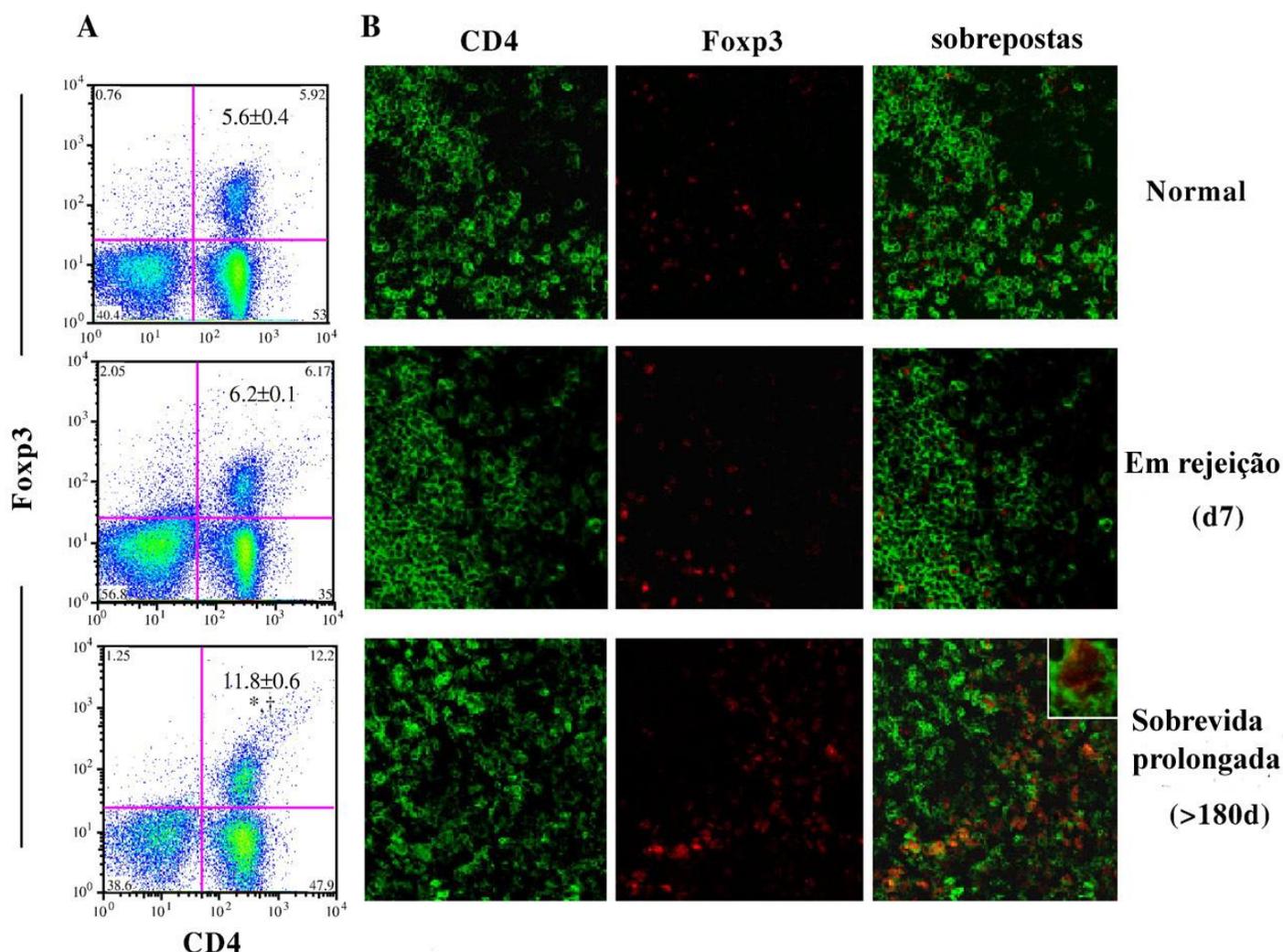


Figura 17 **A**. Gráfico representativo ilustrando a expressão de Foxp3 e CD4 à citometria de fluxo em células T purificadas com malha de náilon (nylon wool), de ratos virgens de tratamento e sem transplante, ratos que não receberam tratamento, porém foram transplantados (grupo controle, 7^o dia PO) e de ratos receptores de alotransplantes com sobrevida prolongada, pertencentes ao grupo +DCp GM+Rapa. Os números nos cantos superiores indicam a porcentagem de células e DP em cada, n=2 ratos por grupo. **B**. Cortes histológicos com técnica imunofluorescente para corar células T Foxp3+CD4+ de baço de ratos virgens de tratamento e sem transplante, ratos que não receberam tratamento, porém foram transplantados (grupo controle, 7^o dia PO) e de ratos receptores de alotransplantes com sobrevida prolongada, pertencentes ao grupo +DCp GM+Rapa. Os baços dos ratos que apresentaram retalhos com sobrevida prolongada mostraram maior expressão de Foxp3 (vermelho) e CD4 (verde) (em detalhe na 3^a figura da 3^a linha). Aumento original x 200; n=2 ratos por grupo, 2 seções por rato.

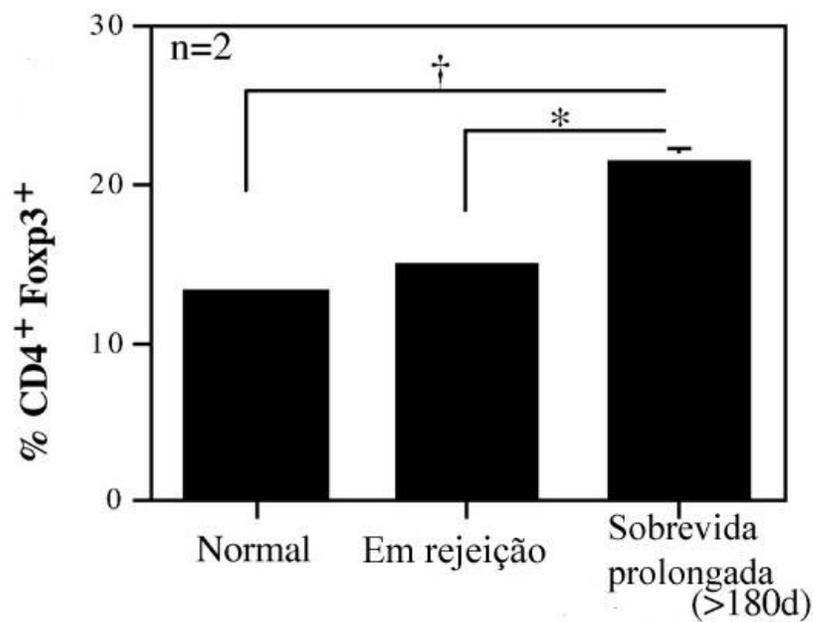


Figura 18. Quantificação de células coradas nas secções de baço tratadas com técnica imunofluorescente. Os dados exibidos representam médias em $\% \pm$ desvio padrão de células T CD4+Fxp3+. A diferença de médias entre baços de receptores de retalhos de sobrevida prolongada (>180d) e de receptores de retalhos rejeitados foi estatisticamente significativa ($*p < 0.01$); bem como a diferença entre cortes esplênicos de ratos não manipulados ($\dagger p < 0.01$).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Milhares de pacientes com membros amputados e com grave perda de tecidos moles beneficiariam-se de reconstruções com RCuA se a barreira imposta pelos episódios de rejeição aguda e toxicidade de drogas imunossupressoras pudesse ser ultrapassada.^{1,3,5,15,48,64-66} (FERREIRA, 1994; FERREIRA, ANDREWS JDE e LAREDO FILHO, 1995; PETIT et al., 2002; KANITAKIS et al., 2003; ANDREW LEE e NGUYEN, 2005; CENDALES et al., 2005; LANZETTA et al., 2005; DEVAUCHELLE et al., 2006).

A alta capacidade da pele de desencadear respostas imunológicas representa um grande obstáculo ao transplante de tecidos compostos. A análise da relação do padrão de secreção de citocinas Th1/Th2 em componentes de retalhos compostos alógenos rejeitados por camundongo receptor evidencia o fato de que a pele é o tecido mais imunogênico, já que a mesma induziu uma maior resposta Th1, característica de episódios de rejeição aguda³⁷ (TUNG et al., 2005). Muitos estudos têm focado na indução de tolerância a aloenxertos de pele^{67,68} (IWAKOSHI et al., 2001; ETO M et al., 2002). No entanto, estas investigações empregaram enxertos de pele, ou seja, pele não vascularizada e de espessura total, que são mais susceptíveis a injúria isquêmica, enquanto que as respostas imunológicas a retalhos cutâneos alógenos raramente têm sido examinados. Retalhos cutâneos alógenos induzem reatividade imunológica imediatamente após a anastomose de vasos sanguíneos e restauração de suprimentos sanguíneos. Estes retalhos tendem a se comportar como transplantes vascularizados, nos quais os aloantígenos são rapidamente levados aos linfonodos de drenagem, onde se dá início a ativação das células T e rejeição do enxerto¹⁴ (OCHANDO et al., 2006). O presente estudo é o primeiro a demonstrar que as terapias baseadas em DC mielóides (DC GM+Rapa) podem promover sobrevida prolongada (>180

dias) de retalhos e que a sobrevida destes retalhos podem ser prolongada indefinidamente através da administração destas células no período pós operatório tardio.

Até o momento, a literatura não demonstrou ser possível a prevenção de rejeição aguda em RCuA utilizando-se terapias celulares e uso transitório de drogas imunossupressoras. Entretanto, vários protocolos experimentais imunomodulatórios envolvendo DC tem sido bem sucedidos no aumento da sobrevida de órgãos alógenos para acima de 100 dias ^{14,21-24,68-71} (BESCHORNER, TUTSCHKA e SANTOS, 1982; GARROVILLO, ALI e OLUWOLE, 1999; LUTZ et al., 2000; GARROVILLO et al., 2001b; PECHE et al., 2005; TANER et al., 2005; LAN et al., 2006; OCHANDO et al., 2006; PECHE et al., 2006).

DC geradas com GM-CSF e IL-4 são sempre lembradas como DC imunogênicas ou “clássicas” ^{21,24} (LUTZ et al., 2000; TANER et al., 2005), porém experimentos em ratos tem demonstrado que quando cultivados com baixas doses de citocinas, a população aderida ao fundo da garrafa (mas não a não aderente) tem mostrado um perfil imaturo, com baixos níveis de moléculas co-estimulatórias e incapazes de secretar citocinas pró-inflamatórias), tinham um fenótipo resistente à maturação e prolongaram significativamente a sobrevida de corações alógenos transplantados²² (PECHE et al., 2005). Taieb et al demonstraram previamente que DC geradas em 6 dias com GM-CSF e IL-4 inibiram a proliferação de células T alógenas e secreção de citocinas, induzindo apoptose precoce destas células. Digno de nota, esta população imatura incluía tanto as células aderentes à garrafa de cultura quanto as não aderentes, em contraste com o relatado por Peche et al ²² (PECHE et al., 2005). Estes resultados encorajaram-nos a otimizar o método de cultura através do aumento da duração da incubação das células derivadas de MO para 8 dias, para que houvesse uma purificação natural das células de MO, evitando assim o uso dos gradientes de densidade Histodenz, que são invariavelmente tóxicos para as células. Como esperado, o novo método aqui descrito resultou em maior número de células, maior pureza (80-85% de pureza para DC GM+IL-4 obtidas em 6 dias, com gradiente Histodenz contra

85-93% de pureza para as DC controle obtidas com o novo método) e apresentaram níveis muito menores da molécula co-estimulatória CD86 (73.6% contra 24%).

Neste estudo foram comparadas as propriedades de duas populações de DC mielóides de ratos, a DC condicionada com GM e IL-4 (DC controle) e a DC condicionada com rapamicina (DC GM+Rapa). As populações também foram analisadas quanto ao potencial de induzir sobrevida prolongada de retalhos cutâneos alógenos transplantados entre raças com total incompatibilidade de MHC.

Inicialmente, as populações DC controle e DC GM+Rapa foram estimuladas com ligantes a receptores *toll-like* (LPS, CpG and polyI:C) para estudo do seu potencial de causar respostas inflamatórias, como descrito nos métodos. Com o objetivo de comparar a produção de citocinas pelas duas populações, inicialmente foi estudada a cinética de secreção das citocinas pelas DC controle. O ponto ótimo para comparação entre as populações foi determinado após análise dos sobrenadantes 12, 24 e 36 horas após a ativação dos receptores *toll-like*. Estes resultados, analisados pelo teste de ANOVA, mostraram que o ritmo de secreção de citocinas (IL-10, IL-6 and IL12p70) não variou significativamente com o tempo ($p > 0,05$). Portanto, a comparação da secreção de citocinas entre as duas populações foi realizada apenas em um tempo, 24 horas após a ativação dos receptores. Um estudo prévio realizado na Universidade de Pittsburgh (RI) demonstrou que quando a secreção de citocinas após estimulação dos receptores *toll-like* foi comparada, a produção de IL-6 pelas DCp GM+Rapa foi maior do que a produção pelas DC GM+Rapa⁷² (IKEGUCHI et al., 2008).

A manipulação imunológica realizada através da via indireta de alo-reconhecimento parece ser crucial para a indução de aceitação de retalhos por períodos prolongados. Recentemente, a importância da apresentação indireta de aloAg tem sido demonstrada utilizando-se bloqueio co-estimulatório para a indução de sobrevida prolongada de enxertos de pele⁷³ (PHILLIPS et al, 2006). Ademais, a administração pré-transplante de DC tratadas com dexametasona que expressam moléculas MHC tanto próprias quanto de doador,

juntamente com CTLA4-Ig e um curso breve de CsA prolonga a sobrevida de retalhos indefinidamente⁷⁴ (MIRENDA et al., 2004). Os pesquisadores do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh também testaram os efeitos dos pulsos com aloantígenos, método que age na via indireta de alo-reconhecimento. Tem sido sugerido que o aumento de sobrevida de ilhotas pancreáticas aloenxertadas e receptores tratados com DC geradas com GM-CSF e IL-4 e pulsadas com peptídeo 5, combinadas com imunossupressão transitória com SAL é parcialmente atribuída à indução de tolerância central⁷⁴ (OLUWOLE et al., 2001). Neste estudo, as DC foram pulsadas com lisados de baço de doador, obtidos segundo o método descrito por Taner et al.²⁴ (TANER et al., 2005), ao invés de peptídeos⁴⁰ (GARROVILLO et al., 2001a), contornando a necessidade de identificar os peptídeos do doador que não são relacionados ao receptor. Seria esperado que o estímulo com aloantígenos fosse aumentar a capacidade estimulatória destas DC. Entretanto, nos experimentos de reação mista de linfócitos, observou-se que ato de pulsar as DC com aloantígenos não influenciou os perfis estimulatórios das DC controle e DC GM+Rapa⁷² (IKEGUCHI et al). Além do mais, nossos dados endossam a importância da apresentação de aloAg pela via indireta de alo-reconhecimento (DC pulsadas com aloAg de doador). Dentre as populações de DC deste estudo, somente as DC GM+Rapa pulsadas com aloAg mostraram-se resistentes à maturação e induziram baixa responsividade de células T do receptor e aceitação do retalho por período prolongado (>180 dias).

Interessantemente, pulsos com aloantígenos por si só não tornaram as DCp controle capazes de induzir sobrevida prolongada dos retalhos, fato observado também quando DC geradas com GM-CSF foram pulsadas com aloantígenos (DCp GM)⁷⁶ (SACKS, 2006). Os pesquisadores do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh compararam as DCp GM com as DCp GM+Rapa e observaram que as últimas exibiam menos CD86, MHC classe II e CD40 e produziram quantidades significativamente menores de IL-6, confirmando o potencial da rapamicina de manter as DC estavelmente imaturas⁷² (IKEGUCHI et al).

O bloqueio da maturação das DC é considerado o principal mecanismo que torna as DC GM+Rapa capazes de induzir sobrevida prolongada de retalhos e de tornar as células T hiporesponsivas a estímulos antigênicos. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de o mecanismo de aceitação do transplante estar baseado na ativação alternativa das DC expostas à rapamicina²⁴ (TANER et al., 2005).

A população DCp GM+Rapa deste estudo diferiu da população gerada por Taner et al, pois foi cultivada sem IL-4 e ainda preservou o fenótipo imaturo resistente a estímulos, promoveu hiporesponsividade antígeno-específica de células T e diminuição de citocinas do padrão de resposta Th1 e Th2 por células T, como a população descrita por Taner²⁴, fato que é benéfico, pois a resposta Th2 por si só, apesar de classicamente considerada anti-inflamatória, pode ser suficiente para rejeição de aloenxertos^{77,78} (VANBUSKIRK, WAKELY e OROSZ, 1996; BUONOCORE et al., 2003). Por outro lado, apesar das DC controle terem mostrado fenótipo imaturo também e não terem produzido IL12p70 com estímulo dos receptores *toll-like*, estas DC secretaram muito mais IL-6 e IL-10 e desencadearam proliferação das células T *in vitro* muito mais intensa.

Na área clínica, uma das maiores vantagens das DC sobre a já instituída terapia com células de MO seria a ausência de DEVH. Entretanto, a maioria dos protocolos imunossupressivos baseados em DC já publicados, encontrariam dificuldades logísticas, já que as DC são administradas pré-operatoriamente na maioria dos casos, com apenas algumas poucas exceções^{71,76} (PECHE et al., 2006; Sacks 2006). Este esquema de administração é pouco prático, especialmente nos transplantes de retalhos compostos alógenos, devido à natureza imprevisível da disponibilidade dos mesmos, pois são derivados de cadáveres. Além do mais, a maioria das estratégias tem usado primariamente DC derivadas de doador¹⁹⁻²¹ (LU et al., 1995; FU et al., 1996; LUTZ et al., 2000), sendo poucos os grupos que utilizaram DC derivadas de receptores^{22,24,71} (PECHE et al., 2005; TANER et al., 2005; PECHE et al., 2006), facilitando a obtenção destas células.

Foi previamente demonstrado pelo grupo de pesquisa do laboratório da Divisão de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh que SAL administrado nos dias -4 e +1, relative ao transplante, combinado com uma dose otimizada de CsA (10mg/Kg/dia por 7 dias) e 2 infusões de DCp GM prolongaram significativamente a sobrevida de RCA de patas traseiras de ratos⁷⁶ (Sacks 2006). Entretanto, como os retalhos alógenos não sobreviveram por mais de 40 dias, o curso de CsA foi aumentado para 21 dias e o método de preparo das DC foi modificado.

Os experimentos subseqüentes do Laboratório de Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh mostraram que as DC GM+Rapa pulsadas com aloantígenos (porém não as não-pulsadas) quando administradas junto com um curso transitório de drogas imunossupressoras prolongaram significativamente a sobrevida dos retalhos compostos alógenos de pata traseira de ratos por mais de 100 dias (>100 dias)⁷² (IKEGUCHI et al). Surpreendentemente, este eficiente protocolo provou ser bem sucedido no desafiador modelo experimental de retalhos cutâneos alógeno.

Devido a resultados insatisfatórios obtidos com o emprego das DC GM+Rapa não pulsadas no modelo de RCA de pata traseira de rato⁷² (IKEGUCHI et al) esta população de DC não foi testada no presente estudo.

Os demais protocolos deste estudo que empregaram DC (DC controle, DCp controle) falharam em prolongar a sobrevida dos RCuA, presumidamente devido ao aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias causado por estímulos multi-fatoriais *in vivo*.

Acredita-se que um dos principais mecanismos responsável pelo aumento da sobrevida de retalhos alógenos seja a expansão de Tregs. A rapamicina também tem sido utilizada para expandir Tregs na terapia celular *ex vivo* para prevenir rejeição de aloenxertos *in vivo*⁷⁹ (BATTAGLIA, STABILINI e RONCAROLO, 2005). As células Tregs tem sido associadas com aumento da sobrevida de aloenxertos, como evidenciado pela detecção de maiores concentrações destas células em enxertos de pele não vascularizados de

camundongos^{17,80} (GRACA, COBBOLD e WALDMANN, 2002; CHAI et al., 2005), aloenxertos cardíacos²³ (LAN, WANG et al. 2006) e LN¹⁴ (OCHANDO, HOMMA et al. 2006) de receptores que tornaram-se tolerantes a aloenxertos utilizando outros protocolos.

Recentemente, Tregs foram encontrados também em retalhos compostos alógenos de mão em paciente cronicamente imunossuprimido, seis anos após o transplante⁸¹ (ELJAAFARI et al., 2006). Nossos dados estão de acordo com estes relatórios. No entanto, até o momento entendemos que este é o primeiro relato que correlaciona o uso das DCp GM+Rapa com o aumento da incidência de Tregs em receptores de RCuA com sobrevida prolongada. A expansão *in vivo* de Tregs pode ter ocorrido devido à transformação de células T CD4+ que entraram em contato com as DCp GM+Rapa ou devido à expansão das Tregs CD4+CD25+ já existentes²³ (LAN et al., 2006).

A recuperação da quebra transitória da tolerância ao RCuA após a enxertia de pele parcial derivada de doador e de terceira raça sugeriu que um mecanismo regulatório local pudesse estar presente no RCuA e ou nos linfonodos regionais, tendo um papel principal no mecanismo de aceitação prolongada. Nossos dados indicam que a tolerância aos RCuA é pelo menos parcialmente regulada pelas Tregs no retalho alógeno e nos linfonodos de drenagem. Tomando como premissa que vários mecanismos estão envolvidos na indução e manutenção de aloenxertos, é tentador especular que estas Tregs produzem IL-10, visto que Ikeguchi et al., utilizando citometria de fluxo, detectaram maiores quantidades de IL-10 nas células T esplênicas de receptores de retalho composto de pata traseira de rato com sobrevida prolongada pelo uso de DCp GM+Rapa⁷² (IKEGUCHI et al.).

A sobrevida dos RCuA no grupo +DCp GM+Rapa poderia ser melhorada ainda mais através da administração de doses adicionais de DC ou substituindo a CsA, que foi administrada como terapia imunossupressora transitória, pela rapamicina. Assim o estado imaturo das DCp GM+Rapa *in vivo* seria reforçado, a produção de citocinas pró-inflamatórias poderia ser evitada e a baixa capacidade das DC de aloestimulação de células T seria mantida⁸² (HACKSTEIN et al., 2003).

O sucesso na prevenção dos episódios de rejeição aguda no componente cutâneo de retalhos compostos alógenos em ratos, através do uso de protocolo clinicamente aplicável e sem necessidade de terapia imunossupressora prolongada permite sugerir que esta estratégia seja empregada em modelos experimentais com animais de maior porte, como porcos ou primatas, para que finalmente possa ser aplicada em seres humanos. Novas terapias imunossupressoras não farmacológicas estão sendo desenvolvidas e testadas no Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 1- A população de DCp GM+Rapa derivadas de MO de ratos apresentou fenótipo e função *in vitro* mais tolerogênicos do que os das DC controle e das DCp controle.
- 2- A administração de duas doses de DCp GM+Rapa nos dias 7 e 14 após o transplante, associadas a SAL nos dias -4 e +1 relativas ao transplante e CsA 10mg/Kg/dia por 21 dias prolongou significativamente a sobrevida de RCuA (>150 dias), quando comparada aos outros protocolos do estudo.
- 3- As DCp GM+Rapa derivadas de MO, quando associadas à imunossupressão transitória com SAL e CsA foram capazes de prolongar a sobrevida de RCuA através de mecanismos associados.

Referências

8. REFERENCIAS

1. Lanzetta M, Petruzzo P, Margreiter R, Dubernard JM, Schuind F, Breidenbach W, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplantation*. 2005;79:1210-1214
2. Bejarano PA, Levi D, Nassiri M, Vincek V, Garcia M, Wepler D, et al. The Pathology of full-thickness cadaver skin transplant for large abdominal defects: a proposed grading system for skin allograft acute rejection. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:670-675
3. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006;368:203-209
4. Benhaim P, Anthony JP, Ferreira L, Borsanyi JP, Mathes SJ. Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation*. 1996;61:527-532
5. Ferreira L. Eficacia da Associação de doses subterapêuticas de ciclosporina e RS-61443 em transplantes alógenos microcirúrgicos de membros - estudo experimental em ratos. In, Programa de Pós Graduação da UNIFESP. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1994
6. Ferreira LM, Anthony JP, Borsanyi JP, Benhaim P, Mathes SJ, Laredo Filho J, et al. [Control of the rejection process treated with cyclosporine and RS-61443, in allogeneic microsurgery transplantation of a limb, in rats]. *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992). 1995;41:11-19
7. Gorantla VS, Prabhune KA, Perez-Abadia G, Ildstad ST, Maldonado C, Orhun HI, et al. Composite tissue allotransplantation in chimeric hosts: part I. Prevention of graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2003;75:922-932
8. Demir Y, Ozmen S, Klimczak A, Mukherjee AL, Siemionow MZ. Strategies to develop chimerism in vascularized skin allografts across MHC barrier. *Microsurgery*. 2005;25:415-422
9. Siemionow MZ, Izycki DM, Zielinski M. Donor-specific tolerance in fully major histocompatibility major histocompatibility complex-mismatched limb allograft transplants under an anti-alpha beta T-cell receptor monoclonal antibody and cyclosporine A protocol. *Transplantation*. 2003;76:1662-1668
10. Carramaschi FR, Landman G, Corsi RC, Vana LP, Ferreira MC. Rat allotransplantation of epigastric microsurgical flaps: a study of rejection and the immunosuppressive effect of cyclosporin A. *Revista do Hospital das Clínicas*. 2000;55:21-28

11. Lim SM, Li SQ. Induction of tolerance to vascularised skin allografts using cyclosporin A--an experimental study on rats. *Ann Acad Med Singapore*. 1991;20:484-487
12. Siemionow M, Demir Y, Mukherjee A, Klimczak A. Development and maintenance of donor-specific chimerism in semi-allogenic and fully major histocompatibility complex mismatched facial allograft transplants. *Transplantation*. 2005;79:558-567
13. Lee WP, Yaremchuk MJ, Pan YC, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. *Plastic and reconstructive surgery*. 1991;87:401-411
14. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006;7:652-662
15. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, Hakim N, Claudy A, Revillard JP, et al. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation*. 2003;76:688-693
16. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006;442:997-1002
17. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*. 2002;195:1641-1646
18. Lee EN, Lee J, Kim EY, Park HJ, Chang CY, Jung DY, et al. Tolerance induction through megadose bone marrow transplantation with two-signal blockade. *J Surg Res*. 2006;130:102-109
19. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation*. 1995;60:1539-1545
20. Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*. 1996;62:659-665
21. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*. 2000;30:1813-1822
22. Peche H, Trinite B, Martinet B, Cuturi MC. Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant*. 2005;5:255-267
23. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, de Creus A, et al. "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol*. 2006;177:5868-5877

24. Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant*. 2005;5:228-236
25. Ali A, Garrovillo M, Jin MX, Hardy MA, Oluwole SF. Major histocompatibility complex class I peptide-pulsed host dendritic cells induce antigen-specific acquired thymic tolerance to islet cells. *Transplantation*. 2000;69:221-226
26. Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News*. 1964;5
27. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353:1315-1320
28. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*. 2003;361:2173-2176
29. Petit F, Minns AB, Dubernard JM, Hettiaratchy S, Lee WP. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery: first clinical applications. *Annals of surgery*. 2003;237:19-25
30. Carrel AG, C. Complete amputation of the thigh with reimplantation. *Am J Med Sci*. 1906;131:297
31. Gorer PA, Loutit JF, Micklem HS. Proposed revisions of 'transplantese'. *Nature*. 1961;189:1024-1025
32. Owen M. The origin of bone cells. *International review of cytology*. 1970;28:213-238
33. Billingham RE, Reynolds J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *British journal of plastic surgery*. 1952;5:25-36
34. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172:603-606
35. Caballero A, Fernandez N, Lavado R, Bravo MJ, Miranda JM, Alonso A. Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transplant immunology*. 2006;17:3-6
36. Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plastic and reconstructive surgery*. 1996;97:139-148; discussion 149-151
37. Tung TH, Mohanakumar T, Mackinnon SE. TH1/TH2 cytokine profile of the immune response in limb component transplantation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116:557-566
38. Feili-Hariri M, Dong X, Alber SM, Watkins SC, Salter RD, Morel PA. Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes*. 1999;48:2300-2308
39. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Regulatory Th2 response induced following adoptive transfer of dendritic cells in prediabetic NOD mice. *Eur J Immunol*. 2002;32:2021-2030

40. Garrovillo M, Ali A, Depaz HA, Gopinathan R, Oluwole OO, Hardy MA, et al. Induction of transplant tolerance with immunodominant allopeptide-pulsed host lymphoid and myeloid dendritic cells. *Am J Transplant*. 2001;1:129-137
41. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunological reviews*. 2003;196:125-146
42. Taieb A, Breitingger JJ, Unadkat JV, Shufesky WJ, Morelli AE, Thomson AW, et al. Intrinsic ability of GM+IL-4 but not Flt3L-induced rat dendritic cells to promote allogeneic T cell hyporesponsiveness. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2007;123:176-189
43. Doi K. Homotransplantation of limbs in rats: A preliminary report on an experimental study with nonspecific immunosuppressive drugs. *Plastic and reconstructive surgery*. 1979;64:613
44. Black KS HC, Fraser LA, Osborne JG, Achauer BM, Martin DC, Furnas DW. Cosmas and Damian Laboratory. *New Engl J Med*. 1982;306
45. Hewitt CW BK, Fraser LA, Osborne JG, Sayles TJ, Achauer BM, Martin DC, Furnas DW. Cyclosporine A is superior to prior donor-specific blood transfusion for the extensive prolongation of rat limb allograft survival. *Transplantation proceedings*. 1983;15
46. Guzman-Stein G, Shons AR. Functional recovery in the rat limb transplant model: a preliminary study. *Transplantation proceedings*. 1987;19:1115-1117
47. Ishiguro N. Composite tissue allograft limb in rats immunosuppressed with cyclosporine A. *Nippon Seikeigeka Gakkai zasshi*. 1989;63:1520-1531
48. Ferreira LM, Andrews Jde M, Laredo Filho J. [Homologous transplantation of a limb (compound tissue): perspective for the future]. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*. 1995;41:151-157
49. Ozer K, Gurunluoglu R, Zielinski M, Izycki D, Unsal M, Siemionow M. Extension of composite tissue allograft survival across major histocompatibility barrier under short course of anti-lymphocyte serum and cyclosporine a therapy. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2003;19:249-256
50. Nguyen VT, Taieb A, Sacks JM, Unadkat JV, Clavijo JA, Kim H, et al. Allopeptide-pulsed dendritic cells and composite tissue allograft survival. *Microsurgery*. 2007;27:105-111
51. Sacks JM, Horibe EK, Lee WP. Cellular therapies for prolongation of composite tissue allograft transplantation. *Clinics in plastic surgery*. 2007;34:291-301, x
52. Zhao XF, Schroeder TJ, Alexander JW, Miskell P, Gonce SJ, Babcock GF. The prolongation of skin allograft survival by topical use of cyclosporine A. *Transplantation proceedings*. 1988;20:670-673
53. Zhao XF, Alexander JW, Schroeder T, Babcock GF. The synergistic effect of low-dose cyclosporine and fluocinolone acetonide on the survival of rat allogeneic skin grafts. *Transplantation*. 1988;46:490-492

54. Enosawa S, Hirasawa K. Examination of sex-associated differences and organ specificities in the survival of cardiac and skin allografts in rats treated with cyclosporine. *Transplantation*. 1989;48:714-717
55. Roelen DL, Schuurhuis DH, van den Boogaardt DE, Koekkoek K, van Miert PP, van Schip JJ, et al. Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation*. 2003;76:1608-1615
56. Sobrado L, Pollak R, Robichaux WH, Martin PC, Sullivan KA, Swartz WM. The survival and nature of the immune response to soft-tissue and composite-tissue allografts in rats treated with low-dose cyclosporine. *Transplantation*. 1990;50:381-385
57. Hirase Y, Kojima T, Takeishi M, Hwang KH, Tanaka M. Transplantation of long-term cryopreserved allocutaneous tissue by skin graft or microsurgical anastomosis: experimental studies in the rat. *Plastic and reconstructive surgery*. 1993;91:492-501
58. Siemionow M, Ozer K, Izycki D, Unsal M, Klimczak A. A new method of bone marrow transplantation leads to extension of skin allograft survival. *Transplantation proceedings*. 2005;37:2309-2314
59. Feili-Hariri M. Cotransplantation of allogeneic bone marrow cells with stromal stem cells for induction of vascularized skin graft survival. *Transplantation*. 2006;82
60. Strauch B, Murray DE. Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm. in external diameter using microsurgical techniques. *Plastic and reconstructive surgery*. 1967;40:325-329
61. Acland R. Interpositional vein grafts. In, *Practice Manual for Microvascular Surgery*. 2nd ed ed. St Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1989:94-104
62. Siemionow M. OR, Ozer K., et al. Induction of donor-specific tolerance in rat hind-limb allografts under antilymphocyte serum and cyclosporine A protocol. *J Hand Surg [Am]*. 2002;27
63. Böyum A. A one stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand J clin Lab Invest*. 1968;21:51-76
64. Andrew Lee WP, Nguyen VT. Perspectives on hand transplantation. *Clinics in plastic surgery*. 2005;32:463-470, v
65. Cendales LC, Kirk AD, Moresi JM, Ruiz P, Kleiner DE. Composite tissue allotransplantation: classification of clinical acute skin rejection. *Transplantation*. 2005;80:1676-1680
66. Petit F, Lantieri L, Guimberteau JC, Hannouche D, Lee WP. [Reconstructive surgery using composite tissue allografts: perspectives from the first clinical cases]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2002;47:222-231
67. Iwakoshi NN, Markees TG, Turgeon N, Thornley T, Cuthbert A, Leif J, et al. Skin allograft maintenance in a new synchimeric model system of tolerance. *J Immunol* 2001;167:6623–30.

68. Eto M, Hackstein H, Kaneko K, Komoto K, Thomson AW. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hematopoietic cell infusions. *J Immunol* 2002;169(169):2390–6.
68. Beschorner WE, Tutschka PJ, Santos GW. Sequential morphology of graft-versus-host disease in the rat radiation chimera. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;22:203-224
69. Garrovillo M, Ali A, Oluwole SF. Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allopeptide-pulsed host dendritic cells. *Transplantation.* 1999;68:1827-1834
70. Garrovillo M, Ali AO, DePaz HA, Gopinathan R, Oluwole OO, Hardy MA, et al. Regulatory role of the thymic dendritic cells in acquired thymic tolerance: induction of tolerance to cardiac allografts by adoptive transfer of allopeptide-pulsed host thymic dendritic cells. *Transplantation proceedings.* 2001;33:149
71. Peche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant.* 2006;6:1541-1550
72. Ikeguchi R, Sacks JM, Unadkat JV, Solari M, Horibe EK, Thomson AW, Lee AW, Feili-Hariri M. Long-term survival of limb allografts induced by pharmacologically conditioned, donor alloantigen-pulsed dendritic cells without maintenance immunosuppression. *Transplantation.* 2008 Jan 27;85(2):237-46.
73. Phillips NE, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. Costimulatory blockade induces hyporesponsiveness in T cells that recognize alloantigen via indirect antigen presentation. *Transplantation* 2006;82:1085–92.
74. Miranda V, Berton I, Read J, Cook T, Smith J, Dorling A, et al. Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: An efficient way to induce indirect pathway regulation. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:987–97.
75. Oluwole OO, Depaz HA, Gopinathan R, Ali A, Garrovillo M, Jin MX, et al. Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific permanent acceptance of rat islets by adoptive transfer of allopeptide-pulsed host myeloid and thymic dendritic cells. *Diabetes.* 2001;50:1546-1552
76. Sacks JM, Ikeguchi, R., Aksu, A.E., Horibe, E., Unadkat, J., Taieb, A., Breiting, J., Thomson, A.W., Feili-Hariri, M., Lee, W.P.A. . Donor antigen-pulsed host dendritic cells combined with transient immunosuppression prolong hind-limb survival *Journal of the American College of Surgeons.* 2006;203
77. VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation.* 1996;62:229-238

78. Buonocore S, Flamand V, Goldman M, Braun MY. Bone marrow-derived immature dendritic cells prime in vivo alloreactive T cells for interleukin-4-dependent rejection of major histocompatibility complex class II antigen-disparate cardiac allograft. *Transplantation*. 2003;75:407-413
79. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2005;105:4743-4748
80. Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, et al. Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*. 2005;79:1310-1316
81. Eljaafari A, Badet L, Kanitakis J, Ferrand C, Farre A, Petruzzo P, et al. Isolation of regulatory T cells in the skin of a human hand-allograft, up to six years posttransplantation. *Transplantation*. 2006;82:1764-1768
82. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, et al. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood*. 2003;101:4457-4463

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível em <http://www.icmje.org>.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. www.bireme.br – terminologia em saúde

ORIENTAÇÃO NORMATIVA PARA ELABORAÇÃO E APRESENTAÇÃO DE TESES. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica UNIFESP.

ISO - International Standard Organization, método Vancouver. Disponível em http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Nomina Anatomica Veterinaria

SUMMARY

Introduction: Clinically applicable protocols capable of promoting operational tolerance to vascularized skin allografts (VSA) would contribute towards a more widespread use of composite tissue allografts (CTA). This study compared tolerogenic properties of different host bone-marrow (BM)-derived dendritic cells (DC) populations in vitro and their potential to prolong survival of VSA across a full MHC mismatch in rats. Methods: DC were generated either with GM-CSF, rapamycin and donor-alloAg-pulsing (GM+Rapa DCp) or GM-CSF and IL-4, with (control DCp) or without alloAg-pulsing (control DC). Phenotype and function were assessed in vitro. We then tested the potential of those DC, combined with transient cyclosporine and anti-lymphocyte serum treatment to mediate prolonged survival of VSA. Graft survival and donor-specific hyporesponsiveness were compared. Presence of Foxp3+CD4+T cells (Tregs) in VSA and secondary lymphoid organs was assessed and quantified by FACS and immunofluorescence. Results: These myeloid DC populations demonstrated LPS stimulation-resistant immature phenotypes. GM+Rapa DC displayed significantly lower T-cell stimulatory capacity and produced less pro-inflammatory cytokines upon TLR activation. When combined with transient immunosuppression, GM+Rapa DCp was the only population to significantly prolong VSA survival (>180days), in a donor-specific hyporesponsive milieu. Significantly higher amounts of Tregs were detected in long-term surviving VSA and secondary lymphoid organs of these recipients. Conclusion: Among the DC populations studied herein, GM+Rapa DCp showed the most tolerogenic profile in vitro and when employed in a clinically applicable protocol in vivo led to operational tolerance of VSA, an unprecedented finding in literature. Furthermore, this is the first report to correlate use of rapamycin-treated DC with Tregs expansion in vivo.

ANEXOS

Técnica de preparo das DC pulsadas com aloantígenos segundo Taner et al²⁴.

As DC foram preparadas como descrito em Métodos. No 7º dia de cultura, foi adicionado às DC lisado de baço alógeno fem uma proporção de 1 DC para 10 esplenócitos por 24hs, a 37º C. Os lisados de baço de ratos Lewis foram obtidos através de 3 ciclos de congelamento/descongelamento rápido em PBS. Para desfazer os aglutinamentos de DC:lisados, as células foram lavadas exaustivamente (3x, 700x g, 5 min) com PBS contendo 5 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) após o pulso.

Técnica operatória do retalho epigástrico microcirúrgico em ratos segundo Strauch e Murray⁶⁰

Basicamente no modelo experimental descrito por Strauch, o procedimento cirúrgico era realizado como se segue: dois retalhos cutâneos medindo 6 x 4 cm, irrigados pelos vasos femorais e epigástricos eram elevados da região epigástrica direita e esquerda do rato doador (Figura 19) e transplantados ortotopicamente para dois ratos receptores.

No rato doador, os limites de dois RCuA foram demarcados na região epigástrica, um à direita e outro à esquerda da linha média. Os limites dos retalhos eram: medialmente, a linha mediana; superiormente, uma linha perpendicular à linha mediana, distando 6 cm da sínfise púbica; inferiormente, uma linha perpendicular à linha mediana, passando pela sínfise púbica, e lateralmente, uma linha paralela à linha mediana distando 4 cm da mesma (Figura 19)

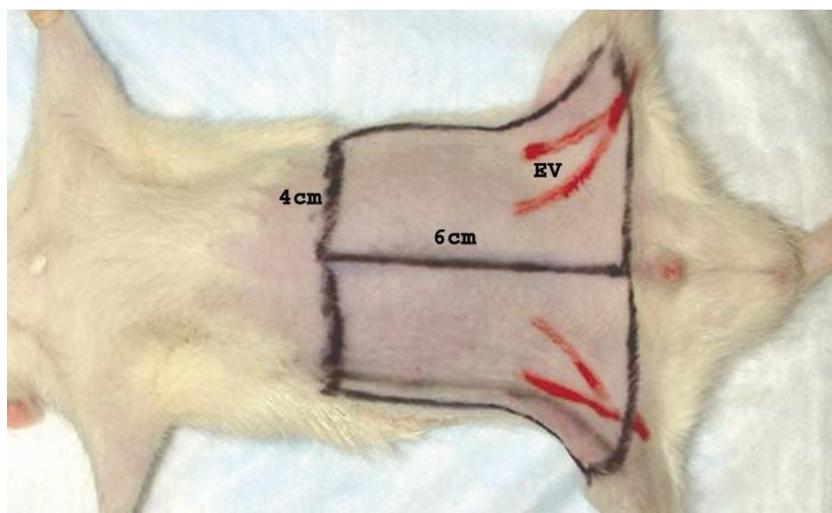


Figura 19. Marcações do retalho epigástrico

Retalhos consistindo de pele, fásia, (panniculus carnosus) e parte do coxim adiposo inguinal foram elevados na direção medial para lateral, até que os vasos epigástricos superficiais pudessem ser vistos por transiluminação. Logo após, a margem lateral foi incisada, incluindo o ramo lateral dos vasos epigástricos superficiais no retalho (Figura 20).

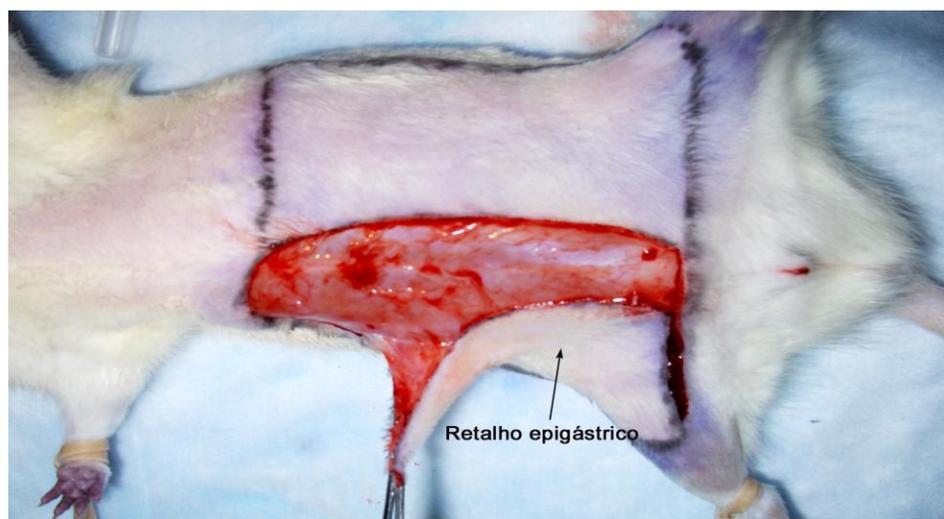


Figura 20. Dissecção do retalho epigástrico, realizado no sentido medial - lateral, no plano pré-aponeurótico da parede abdominal.

Os vasos femorais foram ligados distalmente à origem dos vasos epigástricos e foram transecionados a 0.1 cm distalmente ao ligamento inguinal, liberando o retalho (Figura 21).

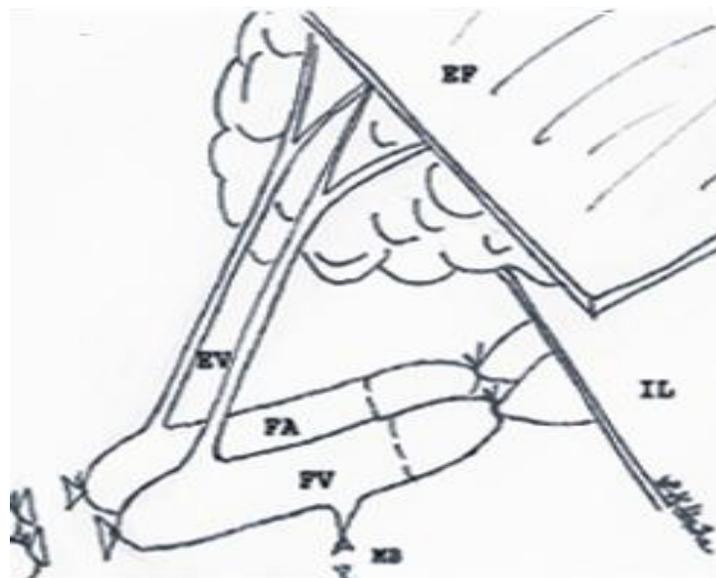


Figura 21: Modelo experimental de retalho epigástrico descrito por Strauch. Preparo do pedículo no rato doador.

EF: retalho epigástrico, EV: vasos epigástricos, FA: artéria femoral, FV: veia femoral, IL: ligamento inguinal.

A artéria femoral foi irrigada com 3ml de solução de Ringer lactato a 4°C, e o retalho foi transferido para um dos ratos receptores. O segundo retalho epigástrico foi então dissecado e transferido para outro rato receptor, que era operado por um segundo cirurgião.

Nos ratos receptores, o retalho epigástrico foi dissecado da mesma maneira descrita para o doador, com exceção do pedículo: os vasos epigástricos foram seccionados em sua junção com os vasos femorais, liberando o retalho epigástrico do leito receptor, que foi descartado. Os vasos femorais foram seccionados proximalmente à origem dos vasos epigástricos. Após o preparo do leito receptor, o suprimento vascular do retalho alógeno foi restabelecido através de anastomose término-terminal entre as veias e artérias femorais do receptor e doador (Figura 22).

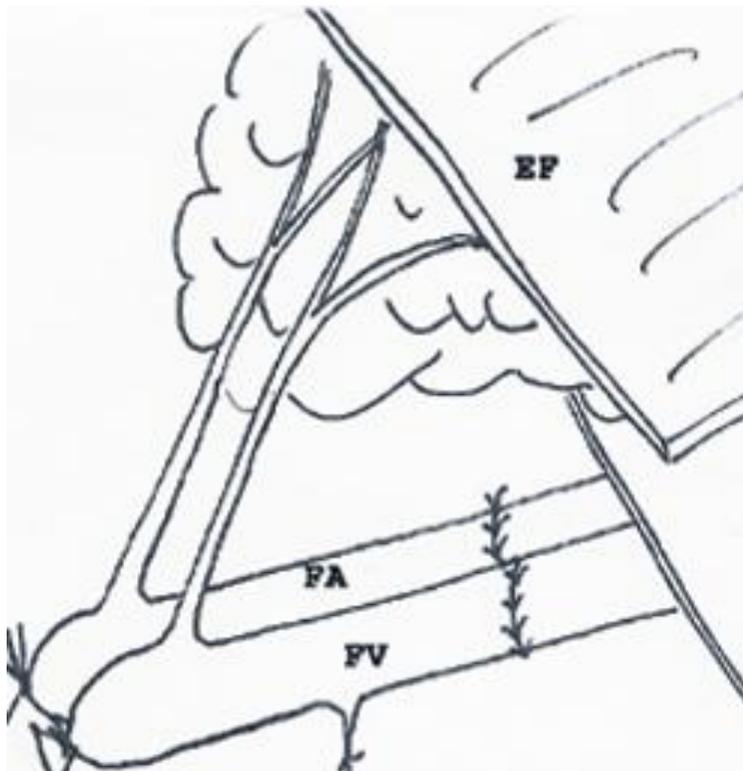


Figura 22: Anastomose término-terminal entre vasos femorais de doador e receptor, segundo a técnica microcirúrgica descrita por Strauch. EF: retalho epigástrico, FA: artéria femoral, FV: veia femoral.

A anastomose venosa foi realizada primeiro, com 9 a 10 pontos simples de náilon 10-0, com auxílio de microscópio Zeiss a 20-30 x de aumento. A anastomose arterial foi completada com 6 a 7 pontos simples.

Os doadores sofreram eutanásia com pentobarbital sódico (100mg/Kg).

Cópia do aceite da Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFESP

Cópia do aceite da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Pittsburgh