

MATTHIAS WOLFGANG MATHONY WEINSTOCK

**TACROLIMUS E RAPAMICINA
EM TRANSPLANTE ALÓGENO
DE TECIDO COMPOSTO**

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

**SÃO PAULO
2012**

MATTHIAS WOLFGANG MATHONY WEINSTOCK

**TACROLIMUS E RAPAMICINA
EM TRANSPLANTE ALÓGENO
DE TECIDO COMPOSTO**

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

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª.LYDIA MASA KO FERREIRA

Prof. Dr. W. P. ANDREW LEE

CO-ORIENTADORES: Prof. AN WAN CHING

Prof^ª. ELAINE KAWANO HORIBE

SÃO PAULO

2012

Weinstock, Matthias Wolfgang Mathony

Tacrolimus e Rapamicina em Transplante Alogênico de Tecido Composto./ Matthias Wolfgang Mathony Weinstock – São Paulo, 2012.
xvii, 127f.

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

Título em inglês: Tacrolimus and rapamycin in composite tissue allotransplantation.

1. Transplante de tecidos. 2. Imunologia de transplantes. 3. Rapamicina.
4. Tacrolimus. 5. Imunossupressão

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

A minha esposa Karina, por seu amor e apoio incondicional.
A minha filha Stephanie, pela lição de vida e vontade de viver.
Ao meu filho Patrick, por ter feito cada momento uma alegria.
Aos meus pais Wolfgang e Klara, por não deixarem de acreditar
mesmo quando eu tinha dúvidas e ao meu sogro Luiz, por todo o seu apoio.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. **LYDIA MASAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, por todas orientações na elaboração desta tese. Pela oportunidade única de realizar parte deste estudo na Universidade de Pittsburgh por meio do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e também pelos valiosos ensinamentos sobre elaboração de pesquisa com rigor científico.

Ao Prof. Dr. **W. P. ANDREW LEE**, CHEFE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH E ORIENTADOR DE PESQUISAS DO LABORATÓRIO DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, por me receber como *research fellow* em seu serviço. Também pela chance 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 do mesmo e às apresentações dele em congressos americanos.

Ao Prof. Dr. **XIN XIAO ZHENG**, PROFESSOR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, pela oportunidade de realizar este projeto e por seus ensinamentos sobre o mundo da imunologia de transplantes.

Ao Prof. Dr. **VIJAY GORANTLA**, DIRETOR ADMINISTRATIVO DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, por seu auxílio constante em aspectos científicos e administrativos durante minha estadia em Pittsburgh.

Ao Prof. Dr **AN WAN CHING**, COORDENADOR DO GRUPO DE MICROCIRURGIA DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DE UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, por seu apoio desde meu tempo de residente e por suas sábias críticas e sugestões.

À Prof^ª. Dr^ª. **ELAINE KAWANO HORIBE** por todos seus ensinamentos em imunologia do transplante por sua ajuda na elaboração e condução do projeto.

Ao Dr. **YONG WANG**, *RESEARCH FELLOW* DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, por seus ensinamentos em microcirurgia e por sua ajuda na execução deste projeto.

Ao Dr. **WENSHENG ZHANG**, *RESEARCH FELLOW* DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, pelos seus ensinamentos e ajuda nos testes realizados em laboratório.

Ao Dr. **ROBERT SUCHER**, *RESEARCH FELLOW* DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH E MÉDICO DA

EQUIPE DE TRANSPLANTE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIVERSIDADE DE INNSBRUCK, na Áustria, por sua amizade, interessantes sugestões e ideias e por compartilhar comigo sua sólida experiência em transplante.

Ao Dr. **RISHI JINDAL**, *RESEARCH FELLOW* DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, por sua atenção e ajuda em momentos fundamentais.

Ao DR. **GERALD BRANDACHER**, DIRETOR CIENTÍFICO DO LABORATÓRIO DE TRANSPLANTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, por suas interessantes sugestões e auxílio para a realização dos testes, necessários para o trabalho, na Universidade de Pittsburgh.

À **SARA BETH PROBST**, COORDENADORA DE PESQUISA DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, pela paciência, apoio e disponibilidade para a obtenção dos mais variados documentos que necessitei durante minha estadia em Pittsburgh.

À **NINA BEEDLE**, SECRETÁRIA DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, pela organização dos documentos que possibilitaram minha ida e permanência na Universidade de Pittsburgh.

A **DOUGLAS MARSTELLER**, TÉCNICO DO LABORATÓRIO

DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE DE PITTSBURGH, pelo amparo 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 EDILEMAR QUEIROZ MONTEIRO, TÉCNICA EM ASSUNTOS EDUCACIONAIS DA CAPES, pela ajuda na realização do Programa PDEE da CAPES.

A MARCELO VASCONCELLOS, FUNCIONÁRIO DA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela assistência administrativa na realização do Programa PDEE da CAPES.

Ao LABORATÓRIO DA DIVISÃO DE BIOLOGIA QUÍMICA, *Biocenter*, da Universidade de Innsbruck, na Áustria, pela realização dos testes para a medição dos níveis de Idoleamina 2,3 dioxigenase.

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, suporte e sugestões.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro das entidades:
Fundos para pesquisa em Cirurgia Plástica da Universidade de Pittsburgh.

EPÍGRAFE

“Um homem não deveria parar de aprender nunca, nem no seu último dia.”

Moses Maimonades (1135-1204)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTAS.....	x
RESUMO.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	08
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
4. MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS.....	62
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	86
NORMAS ADOTADAS.....	96
ABSTRACT.....	98
APÊNDICE.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>ad libitum</i>	à vontade
AF488CD-3	alexa flúor 488 para CD-3
ALS	<i>anti lymphocyte serum</i> (soro antilinfócito)
Anti CD25	anticorpo anti <i>cluster of differentiation 25</i>
BALB/C	raça de camundongo isogênico
BANFF	cidade no Canadá que empresta o nome à classificação clínica de rejeição
B10	raça de camundongo isogênico
CBA	raça de camundongo sogênico
[CBAxBALB/c]F1	raça de camundongo isogênico
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
CD4+	<i>cluster of differentiation 4</i> presente na célula
CD8+	<i>cluster of differentiation 8</i> presente na célula
CD25	<i>cluster of differentiation 25</i>
CD28	<i>cluster of differentiation 28</i>
CD80	<i>cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>cluster of differentiation 86</i>
Células T $\gamma\delta$	célula T subtipo gama delta
cm ²	centímetro quadrado
CTA:	<i>composite allotranplantation</i> (transplante composto alógeno)
<i>et al.</i>	e colaboradores

<i>ex vivo</i>	fora do organismo
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> (fluoroceína isotiocianato)
FK	FK506 ou tacrolimus
FK506	tacrolimus
FKBP	<i>FK binding protein</i>
FKBP-12	<i>FK binding protein 12</i>
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
G	fator de aceleração gravídica
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i> (Comitê de Ética em Pesquisa)
IDO	idoleamina 2,3 di-oxigenase
IL-15	interleucina 15
IL-6	interleucina 6
IL-4	interleucina 4
IL-2/FC	proteína de fusão de Interleucina 2 para a região FC da IgG1
IL-2	interleucina 2
<i>in vivo</i>	ações e experiências nos seres vivos
<i>in vitro</i>	reações fisiológicas feitas fora do organismo, em tubos de ensaio.
Kyn/trp	kinurenina/ triptofano
LSRII	modelo de citômetro de fluxo BD <i>Biosciences</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histo compatibilidade)

mL	mililitros
MMF	micofenolato mofetil
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> (receptor-alvo da rapamicina em mamíferos)
NK	natural killer
NM	nanômetros
nmol/L	mili mol por litro
NOD	não obesos diabéticos
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (solução tampão salina/fosfato)
PE CD4	<i>r-phycoerythrin</i>
PE CD25	<i>peridinin chlorophyll protein CD25</i>
PERCP CD8a	<i>peridinin chlorophyll protein CD8a</i>
PO	pós-operatório
PO 0	pós-operatório zero
PO 5	pós-operatório cinco dias
PO 10	pós-operatório dez dias
PO 15	pós-operatório quinze dias
PO 21	pós-operatório vinte e um dias
PO 45	pós-operatório quarenta e cinco dias
RPM	rotações por minuto
RAG1-/-	raça de camundongo linfopênico
TATC	transplante alógeno de tecido composto
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> (fator de crescimento transformador β)
T $\alpha\beta$	célula T alfa beta
UV	ultravioleta
°C	graus Celsius

% porcentagem

μL microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Incisão circunferencial em coxa de doador Brown-Norway..	40
Figura 2.	Vasos epigástricos dissecados.....	41
Figura 3.	Ligadura dos vasos femorais do doador.....	42
Figura 4.	Pata do rato após ressecção.....	43
Figura 5.	Incisão circunferencial no membro do receptor.....	45
Figura 6.	Dissecção e ligadura dos vasos epigástricos.....	46
Figura 7.	Ligadura dos vasos femorais proximais à proeminência dos vasos epigástricos.....	46
Figura 8.	Corte da musculatura da coxa e osso femoral.....	47
Figura 9.	Colocação de haste intramedular.....	47
Figura 10.	Sutura da musculatura com pontos simples.....	48
Figura 11.	Artéria femoral fixa no clamp com veia já anastomosada	49
Figura 12.	Anastomose arterial.....	49
Figura 13.	Após retirada dos clamps, revisão da hemostasia.....	50
Figura 14.	Pós-operatório imediato após fechamento da pele.....	50
Figura 15.	Marcação dos enxertos em rato Wistar-Furth.....	53
Figura 16.	Marcação dos enxertos em rato Brown-Norway.....	53
Figura 17.	Dissecção da loja e fixação dos enxertos.....	54
Figura 18.	Fixação com curativos de Brown.....	54
Figura 19.	Aspecto do dorso de um animal submetido a teste de tolerância com o enxerto Brown-Norway (integrado)à esquerda e Wistar Furth (rejeitado) à direita 30 dias pós cirurgia de enxerto.....	55
Figura 20.	Enxerto Wistar Furth com rejeição.....	56
Figura 21.	Enxerto de pele de Brown-Norway sem sinais de rejeição....	56

Figura 22.	Citômetro de fluxo.....	59
Figura 23.	Gráfico de curva de sobrevida dos transplantes PO 150.....	65
Figura 24.	Resultados citometria de fluxo FoxP3 ratos 1 e 2 grupo experimental no PO 21.....	66
Figura 25.	Resultado citometria de fluxo rato 3 grupo experimental PO 21.....	67
Figura 26.	Resultados citometria de fluxo rato 1 e 2 grupo experimental PO 45.....	68
Figura 27.	Resultado citometria de fluxo rato 3 grupo experimental PO45.....	69
Figura 28.	Gráfico dos níveis de FoxP3 dos ratos tolerantes em %.....	70
Figura 29.	Média dos níveis de FoxP3 em %.....	70
Figura 30.	Média dos níveis de CD4+CD25+ no PO21 e PO45.....	71
Figura 31.	Níveis de FoxP3 coletado no PO 21 experimento 2 em %.....	72
Figura 32.	Média dos níveis de FoxP3 experimento 2 em %.....	73
Figura 33.	Gráfico dos níveis de Kinurenina sérica no período entre PO 0 e PO 21 em $\mu\text{Mol/L}$	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Grupos referentes ao experimento 1.....	38
Quadro 2.	Grupos referentes ao experimento 2.....	39
Quadro 3.	Rejeição grupo experimental.....	63
Quadro 4.	Rejeição grupo 1.....	63
Quadro 5.	Rejeição grupo 2.....	63
Quadro 6.	Rejeição grupo 3.....	64
Quadro 7.	Níveis de FoxP3 em ratos tolerantes (em % de células).....	66

RESUMO

Introdução: Os mecanismos regulatórios desempenham papel importante na manutenção da tolerância no transplante. pretende-se, neste estudo, desenvolver uma estratégia de tolerância baseada na associação de tacrolimo com rapamicina. **Objetivo:** Estudar efeitos de tacrolimo e rapamicina sobre as células T regulatórias em transplante composto de tecido alógeno. **Métodos:** O modelo foi de transplante composto de Ratos Brown-Norway para Lewis. Foram feitos 2 experimentos. Um para avaliar atividade reguladora dos transplantes e outro para identificar o mecanismo de ação. No experimento 1 dividimos os ratos em 4 grupos, o experimental (tacrolimus do PO 0 ao 7 e rapamicina do PO 8 ao 21). Os outros três: Rapamicina 21d, Tacrolimus 21d e Ambas 21d. Amostras de sangue foram colhidas para citometria de fluxo ao PO 21, PO 45. Em segundo experimento, animais divididos em 4 grupos com terapêutica semelhante ao primeiro, foram submetidos ao mesmo procedimento com coleta de sangue para a medição dos níveis Idoleamina 2,3di-oxigenase no PO 0,5,10,15,21. **Resultados:** No grupo experimental não houve rejeição no PO 150 de 66% dos animais, em dois grupos houve 100% de rejeição e no último 75% de rejeição. No grupo experimental houve significativo aumento nos níveis de células T reguladoras no PO 45 em comparação ao PO 21. No segundo experimento, observou-se uma baixa atividade da IDO no PO 5 em animais recebendo exclusivamente tacrolimus. **Conclusão:** A associação de tacrolimus e rapamicina de forma sequencial leva a um aumento de células T regulatória e à tolerância, bem como uma reduzida atividade da IDO no PO 5 em indivíduos recebendo exclusivamente tacrolimus

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de diversos protocolos de imunossupressão e diversos casos de diferentes tipos de transplante alógeno de tecido composto (TATC) realizado ao redor do mundo, este tem se consolidado como uma opção na reconstrução de grandes perdas (PETRUZZO *et al.*, 2008).

Entretanto, a maioria dos transplantes compostos de tecido alógeno não é vital à sobrevivência dos pacientes, diferente do que ocorre nos transplantes de órgãos sólidos. No TATC, 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 (FERREIRA, 1994; BENHAIM *et al.*, 1996), bem como têm uma tendência a serem pacientes mais jovens, com uma perspectiva de viver mais anos após o transplante em decorrência disso e também por suas melhores condições clínicas, quando comparados com transplantados de órgãos sólidos como rins, coração ou fígado (MADANI *et al.*, 2008). Isto torna relevante evitar imunossupressão e seus efeitos colaterais. A aquisição de tolerância seria o ideal.

Tolerância é um estado em que o sistema imune de um indivíduo não apresenta resposta a um estímulo específico (por exemplo, um órgão transplantado), mas mantém resposta a outros estímulos (por exemplo, uma infecção viral ou bacteriana) na ausência de terapia imunossupressora (GORANTLA *et al.*, 2010).

Devido aos efeitos colaterais associados, necessários à manutenção de um elemento não essencial à sobrevivência, o emprego de transplantes compostos alógenos tem sido considerado controverso (FERREIRA, 1994, BENHAIM *et al.*, 1996). Além disso, estes transplantes são compostos por mais de um tipo de tecido, possuindo diferentes graus de antigenicidade e provocando diferentes respostas imunes no receptor (FERREIRA 1994, BENHAIM *et al.*, 1996).

No caso de um transplante onde há barreira de histocompatibilidade, células T encontram aloantígenos ligados a células apresentadoras do receptor (alorreconhecimento indireto) ou em células apresentadoras do doador (alorreconhecimento direto) (SUCHIN *et al.*, 2001).

Como consequência, a resposta das células T ao aloenxerto há recrutamento de um grande número de clones de célula T. A magnitude do número de clones de células T participando na resposta ao alotransplante é exponencialmente maior do que a resposta de células T contra antígenos nominais (SUCHIN, *et al.*, 2001).

Em consideração à grande frequência de células T alorreativas parece intuitivamente correto que mecanismos deletores podem ter papel na fase de indução de tolerância ao transplante. Enquanto mecanismos deletores são críticos para a indução de tolerância periférica (WOOD, 2003), existem evidências sugerindo que células T regulatórias são também essenciais para a manutenção da tolerância periférica. Na realidade, o equilíbrio entre a população de células T efetoras e células T imunoregulatórias atingido por mecanismos deletores e imunoreguladores determina a tolerância ou rejeição ao transplante (WOOD & SAKAGUCHI, 2003).

Na clínica, o TATC, apesar de já passados 12 anos do primeiro transplante de mão, tem sua durabilidade ligada à evolução da imunoterapia supressora que, nesses casos, tem sido pautada no uso de múltiplas drogas e sem um consenso adequado. Cada serviço tem usado esquemas de preferência própria, a maioria realizando indução com anticorpos policlonais, mas há também uma boa parte usando anticorpos monoclonais.

Um esquema tríplice tem sido a preferência, se usando tacrolimus, por micofenolato mofetil (MMF) e esteroides no início da terapia e na terapia de manutenção, esteroides associados ao tacrolimus ou rapamicina, esteroides e baixa dose de tacrolimus e everolimus, sirolimus e MMF. Em alguns casos houve apenas corte dos esteroides (PETRUZZO *et al.*, 2008).

Os principais protocolos de imunossupressão em transplante tem usado, com grande frequência, os inibidores da calcineurina. Nesta classe de imunossupressores existe a cyclosporina A e o tacrolimus. A calcineurina é uma fosfatase que desempenha atividade em eventos que levam à liberação de interleucina 2 (IL-2) por células T (GORANTLA, *et al.*, 2000). Após se ligar a uma imunofilina chamada FKBP, o tacrolimus inibe a calcineurina, a liberação de IL-2 e, como consequência, a ativação de células T (GORANTLA, *et al.*, 2000). A primeira droga desenvolvida nesta classe foi a ciclosporina, porém em 1985, o tacrolimus (FK506) foi isolado.

Apesar do mecanismo de ação do tacrolimus ser similar, este inibe fases distais à cascata de ativação da calcineurina, parte da cascata de ativação da célula T. E, apesar do tacrolimus ser de 30 a 100 vezes mais potente que a cyclosporina, *in vitro*, isto não foi demonstrado, *in vivo*, a eficácia em diferentes *trials* foi semelhante, entretanto a incidência de

rejeição aguda é mais baixa com o uso de tacrolimus. Embora os dois tenham potencial de induzir lesões fibrogênicas no rim, o tacrolimus tem sido associado com menor expressão de TGF-B.

O impacto da nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina em enxertos de vida longa é difícil de quantificar, mas parece similar em ambos. Riscos cardiovasculares clássicos são mantidos ou agravados após transplante renal. Os inibidores da calcineurina alteram várias dessas variáveis, impactando no risco cardiovascular após transplante (MAES & VANSENTERGHEM, 2004).

Mais recentemente, observou-se um maior uso dos macrolídeos, dentre eles a rapamicina. Ela é extraída de um fungo, *Streptomyces hygroscopicus*, e se liga a uma imunofilina FKBP-12, mas não à calcineurina. Além disso, ela afeta a fase G1 do ciclo celular agindo sobre um alvo celular único, um receptor chamado de *mammalian target of Rapamycin* (mTor). A rapamicina bloqueia eventos independentes do cálcio e bloqueia sinais secundários transmitidos por Interleucina-2, Interleucina-4 e Interleucina-6 para as células T (GORANTLA *et al.*, 2000).

A rapamicina inibe a proliferação celular mediada pela IL-2, mas não a apoptose desencadeada por IL-2 (FERGUSON & GREEN, 1999), enquanto há evidências que células T reguladoras são resistentes à apoptose (BANZ, PONTOX, PAPIERNIK, 2002).

A IL-2 é um importante fator de crescimento das células T. Além do fato de exercer papel na estimulação de células T efetoras, também induz à apoptose das células T e é importante na estimulação de produção de células T regulatórias que limitam a ação das células T efetoras, ou seja,

tem função de tolerância (NELSON *et al.*, 2004). No trabalho, tentando identificar a importância da via da IL-2 nos mecanismos de rejeição e seu bloqueio como opção para evitá-la, observou-se que apenas o bloqueio com anti-CD25 não tem efeito sobre a sobrevivência do transplante (JONES *et al.*, 2001).

Foi relatado que a associação de IL-2 com rapamicina aumentou a apoptose de células T autorreativas e preveniu autoimunidade em camundongos NOD (RABINOVITCH *et al.*, 2002).

O uso de uma proteína agonista da IL-2 a Il-2/Fc associada a uma proteína antagonista da interleucina 15 (IL-15), responsável por eventos citotóxicos e rapamicina, mostrou-se efetivo no aumento dos níveis de células T reguladoras e em induzir tolerância em transplantes de pele e coração (ZHENG *et al.*, 2003).

A IL-2 demonstrou ser diretamente responsável pela expressão de FoxP3 por células T reguladoras, também foi demonstrado que a expressão da FoxP3 é diretamente responsável pelos efeitos imunorreguladores destas células (ZORN *et al.*, 2006).

A combinação de doses subclínicas de drogas imunossupressoras tem sido fundamental na potencialização de sua ação e diminuição de seus efeitos colaterais. Já foi demonstrado que a associação de doses subclínicas de ciclosporina A e micofenolato mofetil foi capaz de inibir rejeição aguda, diminuindo risco de efeitos colaterais, como nefrotoxicidade (FERREIRA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995).

A combinação de doses subclínicas de rapamicina e inibidores da calcineurina se mostrou efetiva na imunossupressão de transplantes e diminuiu efeitos colaterais como hiperlipidemia, trombocitopenia,

hipertrigliceridemia e mielossupressão (KHANNA, 2000). Já a combinação do uso de tacrolimus e rapamicina aumenta a segurança e diminui o índice de nefrotoxicidade (KAHAN, 1998).

Para que os retalhos compostos alógenos sejam mais utilizados em reconstruções de grandes perdas de tecido é fundamental que sejam elaboradas novas alternativas imunossupressoras, sem efeitos colaterais e suficientemente potentes para ultrapassar a barreira da antigenicidade cutânea.

Vários protocolos têm sido usados na prevenção de rejeição aguda, entretanto não há consenso sobre qual terapia adequada, entre elas o uso de doses subterapêuticas de drogas sinérgicas bem como associação de terapias celulares (FERREIRA *et al.*, 1995; GORANTLA *et al.*, 2003).

O tacrolimus é de 30 a 100 vezes mais potente que a cyclosporina, *in vitro*, com incidência de rejeição aguda mais baixa e, apesar dos dois terem o potencial de induzir lesões fibrogênicas no rim, o tacrolimus tem sido associado com menos nefrotoxicidade (MAES & VANRENTERGHEM, 2004).

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Estudar efeitos de tacrolimus e rapamicina sobre as células T regulatórias em transplante composto de tecido alógeno.

LITERATURA

3. LITERATURA

HISTÓRICO TATC, PROTOCOLOS CLÍNICOS

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.

DUBBERNARD *et al.* (1999) publicaram o relatório de seis meses de pós-operatório de transplante de mão. 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. O protocolo de imunossupressão foi composto, na terapia de indução, por globulinas antitimócitos, tacrolimus, ácido micofenólico e prednisona. A terapia de manutenção incluiu os mesmos agentes, excetuando-se as globulinas.

Foram observados sinais clínicos e histológicos leves de rejeição cutânea de 8 a 9 semanas após a cirurgia. Para o tratamento desses episódios foi optado por um aumento na dose de corticoides (prednisona) associada a aplicação de imunossupressores tópicos como o tacrolimus e o clobetasol. Àquela altura, os autores tinham a expectativa que a terapia imunossupressora fosse eficaz contra episódios de rejeição aguda. A expectativa quanto à recuperação funcional também era positiva. Eles esperavam que esta seria semelhante aos casos de reimplante.

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 da mão transplantada, causado pela não aderência do paciente ao tratamento imunossupressor.

Eles relataram que a partir do 15º mês, o componente cutâneo do transplante apresentou pápulas liquenoides que progressivamente se espalharam e coalesceram em lesões difusas eritemato-descamativas. A análise anátomo-patológica mostrou que as alterações mais graves se manifestaram na pele. Uma inflamação leve foi encontrada nos músculos e tendões. Ossos e tendões foram poupados, corroborando com estudos experimentais anteriores, de que a pele é um tecido que apresenta maior imunogenicidade com uma tendência maior a episódios de rejeição.

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 oito pacientes. As anastomoses arteriais para suprimento sanguíneo foram realizadas nos vasos epigástricos inferiores. Sete dos oito pacientes receberam alemtuzumab na indução e tacrolimus para manutenção. Biópsias de pele foram realizadas aleatoriamente e ao haver suspeita de rejeição.

Dos pacientes transplantados, seis sobreviveram e cinco deles com os retalhos alógenos de paredes abdominais intactas. Dois pacientes

apresentaram episódios leves de rejeição aguda que foram resolvidos com corticoterapia. Concluiu-se que este procedimento é uma boa alternativa para os pacientes que necessitam ser submetidos a transplante de intestino e de um aumento do espaço intra-abdominal ou da cobertura cutânea abdominal .

PETIT *et al.* (2003) publicaram uma revisão sobre os casos clínicos de transplante alógeno de tecido composto (TATC) já realizados no mundo. Mencionaram que o transplante de mão, 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.

Apesar de existirem poucos casos no mundo e terem iniciado esse tipo de tratamento a pouco tempo, os autores defendem o uso de TATC. Eles alegam que não é uma técnica nova. Na realidade é realizada uma reconstrução com técnicas microcirúrgicas já bem estabelecidas, associadas à terapias de transplante bem estabelecidas em transplantes de órgãos sólidos. 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 benefícios apresentados pelos autores desta terapêutica em relação o uso de retalhos microcirúrgicos autógenos são ausência de morbidade de área doadora; resultado 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 disseminado .

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 a intenção de registrar informações detalhadas sobre todos os casos de transplantes de retalhos compostos alógenos, realizados desde 1998, possibilitando assim a oportunidade dos participantes se manterem atualizados sobre os últimos desenvolvimentos.

O relatório inicial ofereceu uma revisão dos casos realizados entre setembro de 1998 e setembro de 2004. Em síntese, 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 e 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. Dentre 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 10 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 se tornaram uma realidade clínica, com necessidade de imunossupressão comparável aos dos transplantes de órgão sólido.

PETRUZZO *et al.* (2006) fizeram um relatório sobre os eventos relacionados a dois casos de transplante bilateral de mãos 6 anos após o primeiro transplante. Ambos os casos tiveram terapia de indução com anticorpos monoclonais, prednisona, tacrolimus e micofenolato mofetil e terapia de manutenção com prednisona, tacrolimus e micofenolato mofetil.

O primeiro caso apresentou dois episódios de rejeição aguda no pós-operatório 53 e 82 dias. O segundo paciente nos dias 57 e 86, com variação clínica máculas róseas a pápulas eritematosas, escamosas, levemente infiltradas. As biopsias evidenciaram principalmente fenótipos CD3+/CD4+ ou CD3+/CD8+ com uma baixa porcentagem de células T regulatórias.

Todas as células da epiderme, derme e hipoderme estavam presentes. Foram utilizados prednisona e tacrolimus tópico para tratar os episódios de rejeição aguda. A recuperação motora se deu, inicialmente, nos músculos extrínsecos e, posteriormente, nos músculos intrínsecos, atingindo estágio satisfatório após dois anos. Assim, foi demonstrado que o procedimento cirúrgico poderia ser feito e a terapia imunossupressora se

mostrou eficaz com efeitos colaterais limitados bem como a importância da reabilitação do paciente para recuperar recuperação funcional.

SHUIND *et al.* (2006) apresentaram um relatório de 37 meses de pós-operatório do primeiro transplante de mão realizado na Bélgica. A imunossupressão realizada, neste caso, foi a indução com globulina antitimócitos e prednisona, tacrolimus e micofenolato mofetil na indução e manutenção. Até então, a terapia imunossopressória estava sendo bem aceita com um episódio de hiperglicemia transitória na primeira semana, biópsias de pele no dia pós-operatório 6, 25, 159, 437 e 466, não evidenciaram sinais de rejeição, exceto no dia 437 em que houve um pequeno infiltrado perivascular.

LANZETTA *et al.* (2007), no *Second Report of the International Registry of Hand and Composite Tissue Transplantation*, deram continuidade à troca de informações entre os programas de transplante de mão. Até aquele momento 100% dos pacientes estavam vivos, todas as mãos transplantadas (23 até então) e estavam viáveis após 1 ano de transplante.

As principais complicações foram infecções oportunistas tais como: citomegalo vírus; enterite por *Clostridium difficile*; herpes simples, micose cutânea e osteíte ulnar por *Staphylococcus aureus*. Os efeitos colaterais mais comuns foram: hiperglicemia transitória, valores aumentados de

creatinina e Síndrome de Cushing. Todos se mostraram transitórios e reversíveis.

A cor da pele das mãos, bem como sua textura e pilificação se mostraram normais. A recuperação motora começou pelos músculos extrínsecos, evoluindo posteriormente para os músculos intrínsecos. A recuperação destes últimos em um estágio mais tardio, iniciando 12 meses após o transplante.

A recuperação dos dois grupos musculares permitiu aos pacientes realizar a maior parte das atividades diárias. Após oito anos de experiência clínica em transplante de mão, este se mostrou tecnicamente possível de se realizar e, embora os episódios de rejeição tenham sido revertidos, ainda é necessário o uso de uma combinação de drogas imunossupressoras e o acompanhamento cuidadoso do receptor é mandatório.

BONATTI *et al.* (2009) relataram complicações infecciosas em transplantes duplos de mão. Entre 2000 e 2006 foram avaliados três pacientes submetidos a transplante bilateral de mão (na realidade dois de mão e um no nível do antebraço). Os três casos foram acometidos por doença associada ao citomegalovírus (CMV). O primeiro caso tinha sorologia positiva para CMV no doador e negativa no receptor; os outros dois eram positivos, tanto no doador como no receptor. Os dois primeiros pacientes evoluíram com uma forma complicada desta infecção, sendo necessário utilizar anti-CMV hiperimunoglobulina, foscarnet e cidofovir, com sucesso no controle da infecção; o terceiro paciente evoluiu com uma forma leve da infecção tratado com sucesso com ValGCV.

O receptor do transplante no antebraço evoluiu com diferentes tipos de infecção, provavelmente por causa da intensa dose de imunossupressão, necessária, devido aos episódios recorrentes de rejeição desse paciente como infecção em tecido mole, adquirida durante uma atividade de recreação, a colite associada a *Clostridium difficile* e a Papiloma vírus humano relacionado ao doador.

JABLECKI *et al.* (2009) reportaram episódio leve de rejeição, após modificação no protocolo de imunossupressão. Neste caso, houve evolução adequada durante os primeiros 20 meses sem eventos adversos e recuperação funcional dentro do esperado.

O protocolo de imunossupressão era composto por Cellcept, prednisolona e tacrolimus cuja dose era de 7mg/d. Foi feita uma tentativa de modulação da imunoterapia e foi reduzida a dose de tacrolimus para 4mg/d. Dez dias após a implementação do novo regime, lesões eritematosas leves apareceram na face palmar e dorsal da mão.

Biópsias de pele revelaram infiltrado linfocitário perivascular e Perineural, composto principalmente por células T CD3+. Este episódio foi tratado com metil prednisolona por três dias e creme tópico de Tacrolimus por cinco dias com sucesso.

IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE

CABALLERO *et al.* (2006), demonstraram que os aloantígenos do doador podem ser apresentados ao sistema imune do receptor através de diversos meios. Pelo meio de reconhecimento direto, moléculas classe I e II intactas do doador presentes na célula apresentadora deste são reconhecidas diretamente pelas células CD4+, CD8+ do receptor.

No mecanismo indireto, as moléculas do doador classe I e II são englobadas, processadas e apresentadas no contexto das moléculas MHC do receptor às células CD4+ e CD8+. A resposta contra a apresentação direta apresenta uma grande frequência de células T reativas, enquanto o mecanismo direto apresenta uma baixa frequência destas células.

As células T regulatórias têm se mostrado importantes na limitação da atividade das células T reativas e a rapamicina induz rápida morte celular das células alorreativas diretas .

SEMIONOV & KLIMCZAK (2008), demonstraram que complexos de histocompatibilidade são responsáveis pela rejeição nos tecidos geneticamente diferentes. As moléculas do complexo de histocompatibilidade não são igualmente distribuídas em diferentes tecidos do corpo. As moléculas de classe I estão distribuídas em todas as células do corpo, enquanto as moléculas de classe II estão na superfície dos agentes do sistema imune como células apresentadoras de antígenos, células B e células T ativadas, a expressão delas depende de citocinas, interferon γ e

fator de necrose tumoral. Em última análise, complexos de histocompatibilidade classe II são alvos para rejeição, pois se ligam a antígenos em seus sítios de ligação e os apresentam às moléculas T.

As células T são divididas em dois grupos: as células $T\alpha\beta$ e as células $T\gamma\delta$. As primeiras são responsáveis por quase todas as respostas imunes, enquanto as segundas respondem mais a estímulos virais e bacterianos, além de imunidade antitumoral.

As células $T\alpha\beta$ se dividem em dois grupos. Aquelas que apresentam os antígenos e induzem resposta imune carregam moléculas CD-4 e aquelas que agem de forma citotóxica e carregam moléculas CD-8.

Para a ativação de células T existe uma série de três eventos que devem ocorrer. O primeiro passo é alcançado por meio do receptor de antígeno da célula T através do reconhecimento do antígeno de peptídeos originários do doador em associação de antígenos do complexo de histocompatibilidade expressos no retallo. O passo seguinte da ativação de células T é o envio de sinais coestimulatórios, através da ligação de moléculas como CD-28 a seus ligantes com CD-80 e CD-86 expresso nas células apresentadoras de antígeno do doador.

Quando os sinais coestimulatórios estão completos, as células T secretam interleucina-2 que interage com o seu receptor de antígeno na célula T e gera um terceiro sinal na ativação de célula T. Isto leva à diferenciação das células T. Estas células, na sua maioria CD-4+, participam da rejeição, principalmente através da secreção de citocinas.

PROTÓCOLOS DE IMUNOSSUPRESSÃO NO TRANSPLANTE COMPOSTO ALÓGENO (CTA)

MADANI *et al.* (2008) resumiram o uso de imunossupressores. No processo de indução no transplante é usado uma combinação de agentes que consiste em inibidores da calcineurina (cyclosporina e tacrolimus) e agentes antiproliferativos como o micofenolato mofetil. Estes são suplementados com corticosteroides e imunossupressão por anticorpos. Já a terapia de manutenção explora os efeitos sinérgicos para reduzir as doses e os efeitos colaterais da imunossupressão. Os resultados em transplante renal têm demonstrado o sucesso dessas terapias, mas também têm evidenciado suas complicações.

MECANISMO DE AÇÃO DA RAPAMICINA E SUA AÇÃO MANTENDO IL-2

DUMOND & SU (1996), em revisão do mecanismo de ação da rapamicina, lembraram que esta droga havia, até então, se mostrado efetiva em modelos animais de transplante, evitando rejeição e prolongando a sobrevida dos transplantes, tanto de pele como de órgãos sólidos e realizando a integração de células de medula óssea.

A rapamicina já tinha se mostrado efetiva sozinha ou em associação com baixa dose de ciclosporina no pré-tratamento de órgãos transplantados, aumentando sua sobrevida após o transplante. Também se mostrou efetiva em evitar tanto rejeição aguda, como crônica.

Esta droga não inibe a ativação dos genes de linfocinas em células T dependente da calcineurina, porém bloqueia o processo de ciclo celular das células T na fase G1, impedindo sua progressão para fase S, permitindo a reentrada, nesta fase, de duas a quatro horas após a interrupção de sua administração. Seu mecanismo de ação não se mostrava específico para a proliferação de células T mediada por IL-2. Também se mostrava efetiva na inibição de expressão de granzima B, apesar da presença de células T CD8+, indicando que estas poderiam não ter recebido estímulo para sua atividade citopática.

Já estava demonstrado que a rapamicina formava um complexo com a proteína *FK Binding protein 12* (assim como o tacrolimus), mas este complexo se ligava com um receptor denominado mTOR (*mammalian target of rapamycin*).

MEIER-KRIESCHE & KAPLAN (2000) avaliaram diversos estudos levando em conta a toxicidade e eficácia da rapamicina. Esta droga alcança sua concentração máxima em 1 a 3 horas, apresentando uma meia vida de 60 horas, distribuindo-se em diferentes tecidos e sua administração associada à ciclosporina pode melhorar esta distribuição. Ela comprovou ser eficaz em diminuir episódios de rejeição aguda, entretanto se mostrou associada à trombocitopenia, leucopenia e à hiperlipidemia, bem como a contagem de plaquetas se mostrou menor em pacientes recebendo doses maiores de rapamicina. Neste caso, os triglicérides se mostraram aumentados.

NAPOLI & TAYLOR (2001) escreveram extensa revisão sobre a rapamicina. Demonstraram o que estava claro até então, concordando com o que foi mencionado acima, que esta droga age mantendo a célula entre a fase G1 e S , diferente do tacrolimus e ciclosporina que agem em etapas precedentes ligadas à ativação de calcineurina.

A rapamicina inibe proliferação e crescimento estimulado por citocinas em células imunológicas. Sua ação sobre células natural killer e citotoxicidade, dependente de anticorpos, depende de doses maiores. Foi confirmado o sinergismo entre a rapamicina e os inibidores da calcineurina através de experimentos *in vitro*.

Após formar um complexo com a FKBP-12, a rapamicina se liga a um receptor, a MTOR (como descrito acima), que regula a progressão do ciclo celular a partir de G1. Evidências mostram que por inibição da fosforilação, dependente de interleucina 2 da proteína ribossomal p70, o recrutamento da p70 parece ser comum à cascata de ativação CD3 e CD28 das células T.

In vivo, em transplantes renais, a rapamicina se mostrou eficaz com terapia primária.

SEHGAL (2003) abordou os principais achados sobre a rapamicina, desde seu descobrimento até temas já abordados como a formação do complexo com FKBP e a ligação com mTOR. Foi mencionado que a rapamicina inibe a proliferação de células alteradas da linhagem linfóide, células nervosas hepáticas, melanocíticas, osteoblásticas, miogênicas, renais, tecido conectivo, bem como a proliferação de células B e T,

transformadas por HTLV-1 e EBV. Em camundongos, o uso de rapamicina foi efetivo contra certos tumores de cólon.

Apesar de inibir a proliferação de células T induzida por IL-2 a rapamicina não impede o sinal que resulta na apoptose celular.

THEVET (2006) revisou situações em que procurou se retirar o uso de ciclosporina devido a seus efeitos colaterais (especialmente nefrotoxicidade) e trocar pelo uso de rapamicina. Ele mostrou estudos em que a associação de ciclosporina e rapamicina diminuiu a incidência de rejeição aguda, entretanto aumentou o nível de nefrotoxicidade em comparação à associação de ciclosporina e micofenolato mofetil.

Neste estudo foram avaliados cinco ensaios clínicos randomizados realizados na Europa, Canadá, EUA e Austrália. Nesta experiência, os pacientes submetidos a transplantes recebiam, nos primeiros três meses, terapia combinada de ciclosporina e rapamicina.

Após três meses, os pacientes elegíveis, de acordo com ausência de rejeição aguda e função renal normal, eram randomizados com o objetivo de retirada de ciclosporina e manutenção da rapamicina. Como resultado, observou-se que não houve aumento da mortalidade dos pacientes após a retirada de ciclosporina, bem como alteração na curva de sobrevivência do transplante.

Na realidade, houve um aumento na curva do grupo mantido só com rapamicina, entretanto houve um aumento nos episódios de rejeição aguda, porém não sem diferença estatística. Finalmente, pacientes submetidos à

retirada de ciclosporina e manutenção com rapamicina tiveram melhora significativa na função renal.

BREWER *et al.* (2008), devido ao fato de um dos efeitos colaterais da rapamicina ser a limitação do processo de recuperação da ferida, bem como estar associado a um aumento na incidência de deiscência de sutura, estudaram os índices dessas complicações em pacientes que receberam rapamicina, submetidos à cirurgia dermatológica, em comparação a pacientes recebendo ciclosporina ou tacrolimus. Verificaram que houve maior incidência de infecções pós-operatórias e deiscência em pacientes recebendo rapamicina.

MÜLLER-STEINHARDT *et al.* (2008), em um estudo *in vitro* e *ex vivo*, observaram a expressão do perfil de citocinas no sangue de pacientes recebendo rapamicina. Na cultura *in vitro* de sangue de indivíduos saudáveis, quando adicionado rapamicina houve, após 24 horas, uma diminuição dos níveis de IL-2. Entretanto, isto não ocorreu de forma homogênea nos indivíduos. Alguns, após quatro horas, apresentavam uma atividade maior da IL-2. Isto se repetiu em experimento *ex vivo*. Foi postulado por estes autores que, de uma maneira geral, o uso de rapamicina pode controlar a ação da interleucina 2, mas que este efeito pode ser dose dependente e variável entre indivíduos diferentes.

HORIBE *et al.* (2008) observaram que a administração de células dendríticas do doador, condicionadas com rapamicina e pulsadas com aloantígeno, aumentava a sobrevida de transplantes alógenos devido à diminuição da responsividade imune das células T. Também relataram um aumento significativo das células T regulatórias nos baços dos animais que apresentaram longo tempo sem apresentar rejeição dos transplantes.

IDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE E SUA PARTICIPAÇÃO EM MECANISMOS REGULATÓRIOS

JIANPING *et al* (2007) desenvolveram um estudo que, através de um adeno vírus recombinante, administraram clone de genes de Idoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) a corações transplantados de ratos Fisher para Lewis.

Observou-se que, *in vitro*, o gene com o código da IDO inibia as células T. Este gene também prolongava a vida desses enxertos, entretanto para uma sobrevida mais extensa foi necessário administrar um dose baixa de ciclosporina A. Houve também uma diminuição do infiltrado leucocitário bem como a expressão de citoquinas, ou seja, neste modelo houve um prolongamento na sobrevida dos transplantes sendo necessário, entretanto, uma terapia com ciclosporina A para estender esta sobrevida.

O mecanismo de ação que leva a este resultado não ficou claro ainda. Dentre as possibilidades levantadas por Jianping está a inibição direta de células CD4+, CD8+ e natural killer (NK) por metabólitos do triptofano.

HAUTZ *et al.* (2009) observaram que os níveis de FoxP3 e IDO se mantêm semelhantemente baixos ou altos de acordo com os episódios de rejeição.

IMPORTÂNCIA DA CÉLULA T REGULATÓRIA NOS MECANISMOS TOLEROGÊNICOS

SCULLY *et al.* (1994) verificaram que usando um anticorpo para bloquear as células CD4 e CD8 foi possível causar tolerância de camundongos CBA/Ca (receptor) a camundongos B10.BR. Ao extrair linfócitos destes animais e transferir concomitantemente a camundongos recebendo o meso transplante, observou-se um comportamento de tolerância após cinco semanas.

SAKAGUCHI *et al.* (1995) investigaram mecanismos de tolerância mantidos por células pré-ativadas expressando CD25. Primeiramente, os autores confirmaram se a eliminação de células CD25 poderiam estimular doenças autoimunes. Assim, suspensões de células de baços de camundongos BALB/c nu/+ ou +/+ foram depletadas de suas células CD25 e então inoculadas em camundongos BALB/c nu/nu, levando ao aparecimento de lesões inflamatórias em vários órgãos, dependendo da dose de células inoculadas.

Por outro lado, a transferência de suspensões celulares enriquecidas com células CD4+CD25+ permitiu a prevenção de doenças autoimunes. Os autores também observaram se estas células poderiam influir na reação contra antígenos externos ao organismo. Neste caso, observaram que as células CD25+ causam diminuição na resposta celular e humoral contra este tipo de antígeno.

COBBOLD *et al.* (1996), em uma revisão do que havia sido observado até então, mencionaram que o uso de anticorpos não depletadores anti CD4 e anti CD8, administrados concomitantemente, poderiam induzir tolerância. Já havia observado também casos em que camundongos CBA/Ca receberam transplante de pele de BALB.K e depois receberam anticorpos não depletadores antiCD4 e CD8 e desenvolveram tolerância.

KINGSLEY *et al.* (2002) realizaram estudo demonstrando que células CD4+CD25+ podem prevenir rejeição. Neste estudo, camundongos CBA receberam tratamento com anticorpo anti CD4 no dia -28 e -27. No dia -27 eles também receberam transfusão específica do doador (B10) ou sangue de uma terceira parte (BALB/c). Baços foram preparados, no dia 0, para isolamento de células camundongos deficientes em célula T (Rag -/-) e foram reconstituídos por via intravenosa com células T fracionadas ou permaneceram não tratados. Estes animais receberam transplante de pele de camundongos B10. Os animais imunodeficientes que não apresentam

rejeição, receberam células CD4⁺ CD45RB *high* retiradas do baço e linfonodos de camundongos CBA naive, induzindo rejeição que foi evitada com o uso de contra transferência de células CD4⁺CD25⁺, extraídas dos baços dos animais pré-tratados com anticorpo anti CD4.

Os autores também investigaram se a regulação deste sistema era aloantígeno específica. Para tal, eles isolaram células T CD4⁺CD25⁺ dos animais tratados com sangue de terceira parte (BALB/c) sob o uso de anticorpo antiCD4. A contratransferência de células T CD45RB *high* CD4⁺ (de animais naive) causou rejeição do enxerto B10 dos camundongos pré-tratados, evidenciando ser um fenômeno antígeno específico.

Para determinar se ambos aloantígeno do doador e anticorpo anti CD4 são necessários para a geração de células T CD4⁺CD25⁺, camundongos receberam pré-tratamento apenas com anticorpo anti CD4 ou somente transferência específica de doado. Células CD4⁺ CD25⁺ isoladas de um ou de outro grupo foram incapazes de regular rejeição. Também foi tentado o uso de células CD4⁺CD25⁺ de animais naive sem sucesso no controle da rejeição.

GRAÇA *et al.* (2002)(A), sabedores 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.

Tiveram como objetivo determinar se as células 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 retransplantados 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 receptor.

GRAÇA *et al.* (2002)(B), pesquisando o papel das células CD4+CD25+ e CD4+CD25- na tolerância ao transplante, submeteram camundongos CBA/Ca à timectomia e transplante de pele de camundongos B10.BR. Tolerância foi induzida com anticorpos anti CD4 e CD8, sendo usado camundongos CPI-CBA como receptores com células depletadas para transfusão de células.

Esta raça é compatível com CBA/Ca e permite depleção seletiva com anticorpo humano anti CD52 (Campath-1H). Os animais com células depletadas foram transfundidos com células de baços de animais tolerantes e de animais naive e depois receberam transplante de pele de B10.

As células do baço de tolerante falharam em rejeitar os enxertos de pele, bem como revogaram rejeição por células T naive. Ao usar células CD4+ CD25+ e CD4+ CD25- isoladas de baços de camundongos CBA/Ca,

notou-se redução da rejeição em animais que receberam CD4+CD25+. Entretanto, animais que receberam células diversas de baço tiveram um nível de rejeição semelhante àqueles que receberam CD4+CD25-.

Usando células de animais tolerantes CD4+CD25+, mostrou-se eficaz em evitar rejeição, porém CD4+CD25- numa fração 10 vezes maior também se mostrou eficaz. Estes resultados permitem inferir que ambas células induzem tolerância, sendo uma 10 vezes mais potente que a outra.

ZHENG *et al.* (2003) desenvolveram um protocolo em que avaliaram a influência da IL-2 na atividade de células T reguladoras e conseguiram modular os níveis dessas células com a associação dessa interleucina e rapamicina.

Para avaliar se o protocolo poderia não somente prolongar a sobrevivência do transplante, mas também induzir tolerância específica ao doador, foi realizado um transplante de terceira parte e um secundário de mesmo doador. O transplante secundário foi aceito, mas não o de terceira parte.

Finalmente, para avaliar se as células CD-4+/CD25+ tinham um papel na indução da tolerância, foram escolhidos indivíduos previamente tolerantes e realizado depleção de células T reguladoras com anticorpo anti-CD25 com posterior transplante de pele. Todos os indivíduos rejeitaram demonstrando que a modulação de células T reguladoras exerce papel importante para se alcançar tolerância.

GRAÇA *et al.* (2004), estudando o comportamento das células CD4⁺/CD25⁺, injetaram células CD4⁺/CD25⁺ de baços de camundongos CBA não estimulados associados a células T CD4⁺ em camundongos linfopênicos RAG1^{-/-}. Os animais transfundidos foram submetidos a transplantes de enxertos de pele de camundongos, BALB/c, (CBA x BALB/c)F1, B10 ou (CBAxB10)F1, não foi observado rejeição em nenhum destes grupos.

As DC plasmocitoides adquiriram o aloAg no aloenxerto e induziram a geração de células tregulatórias CCR4⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺(Tregs). A depleção de DC plasmocitoides ou o impedimento da chegada da linfa ao linfonodo inibiu 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 plasmocitoides, apresentadoras de aloAg, migraram para os linfonodos e mediaram o desenvolvimento das células Tregs aloAg-específicas, induzindo tolerância ao aloenxerto.

OCHANDO *et al.* (2006) publicaram um importante trabalho sobre as DC plasmocitoides, identificando-as como exercendo papel na indução de tolerância a alotransplantes cardíacos vascularizados. As DC plasmocitoides adquiriram o aloAg no transplante e induziram a geração de células tregulatórias CCR4⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺(Tregs). A depleção de DC plasmocitoides ou o impedimento da chegada da linfa ao linfonodo inibiu o desenvolvimento das células Tregs levando a rejeição do

transplante.

Estes autores demonstraram por outra via que a indução de células Tregs é fundamental para se alcançar tolerância.

WALDMANN *et al.* (2006) descreveram que diversos estudos têm demonstrado a presença de células T reguladoras CD4⁺/CD25⁺ tem papel importante na indução da tolerância.

DEMIRKIRAN *et al.* (2006), em um estudo em que foram avaliados pacientes submetidos a transplante de fígado, colheram amostras de sangue desses pacientes antes e em diversas ocasiões após este transplante, sendo o controle obtido de 16 voluntários sadios.

As amostras de sangue periférico foram submetidas à análise por citometria de fluxo para a verificação dos níveis de células T reguladoras. Observou-se redução das células T reguladoras após transplante. Foi estabelecido uma ligação entre os níveis de células T reguladoras e episódios de rejeição nos primeiros 3 meses após o transplante.

Um ano após o transplante, verificou-se um nível significativamente mais baixo de células T reguladoras nos pacientes que vivenciaram episódios de rejeição. Foi testado também o comportamento da população de células T reguladoras frente a diferentes regimes imunossupressórios e se observou que pacientes, recebendo inibidores da calcineurina (ciclosporina A e tacrolimus), apresentavam redução dos níveis de células T reguladoras.

Segundo TAIEB *et al.* (2007), para a indução do mecanismo de tolerância é necessário a passagem por dois estágios. O primeiro é a inativação das células T reativas ao doador maduras, pré-existentes para evitar a rejeição da medula óssea do doador. O evento secundário envolve uma inativação vitalícia ou eliminação de células T reativas neo formadas para manter a tolerância.

GORANTLA *et al.* (2010) corroboram evidências que as células T reguladoras têm papel importante nos mecanismos tolerogênico. Estas células têm um gene transcricional que ativa seu desenvolvimento e função.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Tipo de estudo:

Primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico e aleatorizado.

Comitê de ética:

University of Pittsburgh: 1001456A-2, assurance number: A3187-01
UNIFESP: 0631/08

Estudo piloto:

Foram realizados transplantes de pata traseira de Brown-Norway para Lewis em seis animais, sendo que todos receberam soro antilinfocitário no PO -4 e PO 1, dois receberam 7 dias de tacrolimus 2mg/kg/dia seguido de 0,5mg/kg/dia de rapamicina, dois receberam a mesma dose, porém 21 dias de rapamicina e os dois últimos receberam 2 mg/kg/dia de tacrolimus por 7 dias seguido de uma dose mais baixa de rapamicina (0,25mg/kg/dia) por 21 dias.

Exceto os animais que receberam 2mg/kg/dia de tacrolimus seguido de 14 dias de rapamicina 0,5mg/kg/dia, todos rejeitaram antes do PO 45. Assim, confirmam-se a escolha da terapia de 7 dias de tacrolimus seguido de 14 dias de rapamicina.

Animais:

Ratos machos Lewis, Brown Norway, Wistar Furth foram adquiridos de Hiland Laboratory com oito semanas de idade com peso entre 200 e

250g. Eles foram mantidos em ambiente livre de patógenos no Biotério Central da Universidade de Pittsburgh, seguindo as normas do IACUC da Universidade de Pittsburgh e do Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo *National Institutes of Health* recebendo alimentação e água *ad libitum*.

Houve divisão em duas etapas. A primeira foi chamada de experimento 1 e o intuito era avaliar a curva de sobrevivência e estabelecer possíveis dados comparativos em possíveis animais tolerantes. Já a etapa seguinte foi chamada de experimento 2 e consistiu em submeter a transplante uma série de animais para tentar encontrar um mecanismo de ação desse protocolo.

EXPERIMENTO 1

O grupo experimental (TABELA 1) foi formado por transplantes de pata traseira (esquerda ou direita escolhido de forma aleatória) de ratos Brown-Norway para Lewis nesse grupo.

A terapia de indução à imunossupressão foi realizada com soro antilinfócito 4 dias antes da cirurgia e no primeiro pós-operatório. Os ratos foram medicados por via intraperitoneal com tacrolimus (Tecoland, Boston, USA) (2mg/kg/d) por 7 dias seguido de rapamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,5mg/kg/d), a partir do oitavo dia de pós-operatório por 14 dias.

No pós-operatório 120 dias, estes ratos foram submetidos a enxerto de pele de ratos Brown-Norway e Wistar Furth para realizar teste de tolerância como enxerto de terceira parte foi usado Wistar Furth. Foi

considerado final do experimento rejeição grau 3 (segundo escala visual de BANFF)(CENDALES et al,2008) ou >150 dias. Os ratos foram submetidos à coleta de sangue da cauda para realização de citometria de fluxo no pós-operatório 21 dias, 45 dias, e ao final do experimento. Ao final do experimento foi realizado eutanásia, utilizando-se câmara de dióxido de carbono (CO₂).

Foram submetidos à cirurgia mais três grupos de ratos (QUADRO 1) para a formação dos grupos para comparação terapêutica. Realizaram-se transplantes de Brown-Norway para Lewis e todos receberam terapia de indução com soro antilinfócito no pré-operatório 4 e pós-operatório 1. Os grupos receberam, respectivamente, tacrolimus por 21 dias, rapamicina por 21 dias e rapamicina e tacrolimus durante 21 dias concomitantemente.

QUADRO 1 Grupos referentes ao experimento 1					
Grupos	Tratamento	N	Citometria de fluxo para FoxP3	Teste de tolerância PO 120	Curva de sobrevida
1	ALS + tacrolimus 21d	4			Sim
2	ALS + rapamicina 21d	4			Sim
3	ALS + tacrolimus + rapamicina 21d	4			Sim
4	ALS + tacrolimus 7d + rapamicina 14d	6	PO 21, 45,150	Sim	Sim

EXPERIMENTO 2

Para identificar o mecanismo de ação foi realizado um segundo experimento com os mesmos grupos utilizados no experimento inicial (QUADRO 2). Foram submetidos a transplante de pata traseira (esquerda ou direita escolhido de forma aleatória) Brown-norway para Lewis três ratos do grupo experimental e grupos complementares, sendo que em cada dia cirúrgico se submeteu a transplante um rato de cada grupo.

Estes animais receberam os mesmos tratamentos por 21 dias e ao final deste período sofreram coleta de sangue para a realização de citometria de fluxo. Estes ratos também foram submetidos à coleta de sangue para a medição dos níveis de indoleamina 2,3-dioxigenase, nos dias de pós-operatório 0, 5, 10, 15, 21.

QUADRO 2 Grupos referentes ao experimento 2				
Grupos	Tratamento	N	Indoleamina 2,3-dioxigenase	Citometria de Fluxo para FoxP3
1	ALS + tacrolimus 21d	3	PO 0, 5, 10, 15, 21	PO 21
2	ALS + rapamicina 21d	3	PO 0, 5, 10, 15, 21	PO 21
3	ALS + tacrolimus + rapamicina 21d	3	PO 0, 5, 10, 15, 21	PO 21
4	ALS + tacrolimus 7d + rapamicina 14d	3	PO 0, 5, 10, 15, 21	PO 21

TRANSPLANTE DE PATA

Os ratos Lewis receberam transplantes de pata traseira de doadores Brown-Norway e foram divididos nos seguintes grupos: (1) soro antilinfócito (ALS Accurate Chemical, Westbury, NY, USA) + tacrolimus 21 dias; (2) ALS + rapamicina 21 dias; (3) ALS + tacrolimus + rapamicina 21 dias; (4) ALS + tacrolimus 7 dias + rapamicina 14 dias.

Os ratos Brown-Norway (doadores) e Lewis receptores foram escolhidos de forma aleatória. Inicialmente foi realizada uma anestesia intraperitoneal com pentobarbital sódico 40mg/kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após anestesiado, as patas traseira e região abdominal foram submetidas à epilação com depilador elétrico.

Uma incisão circunferencial na pele da raiz da coxa do doador foi realizada.



FIGURA 1 Incisão circunferencial em coxa de doador Brown-Norway

Foi realizada disseção e ligadura dos vasos epigástricos inferiores.



FIGURA 2 Vasos epigástricos dissecados
(FERREIRA LM, 1994)

A artéria, veia e nervo femoral foram então dissecados. Após lavar a artéria femoral e a veia com solução de Ringer Lactato (Sigma Aldrich, USA) com heparina, 1U de heparina por ml de Ringer (Baxter, Viena, Áustria), a veia femoral foi ligada e seccionada o mais próximo possível (adjacente ao ligamento inguinal).

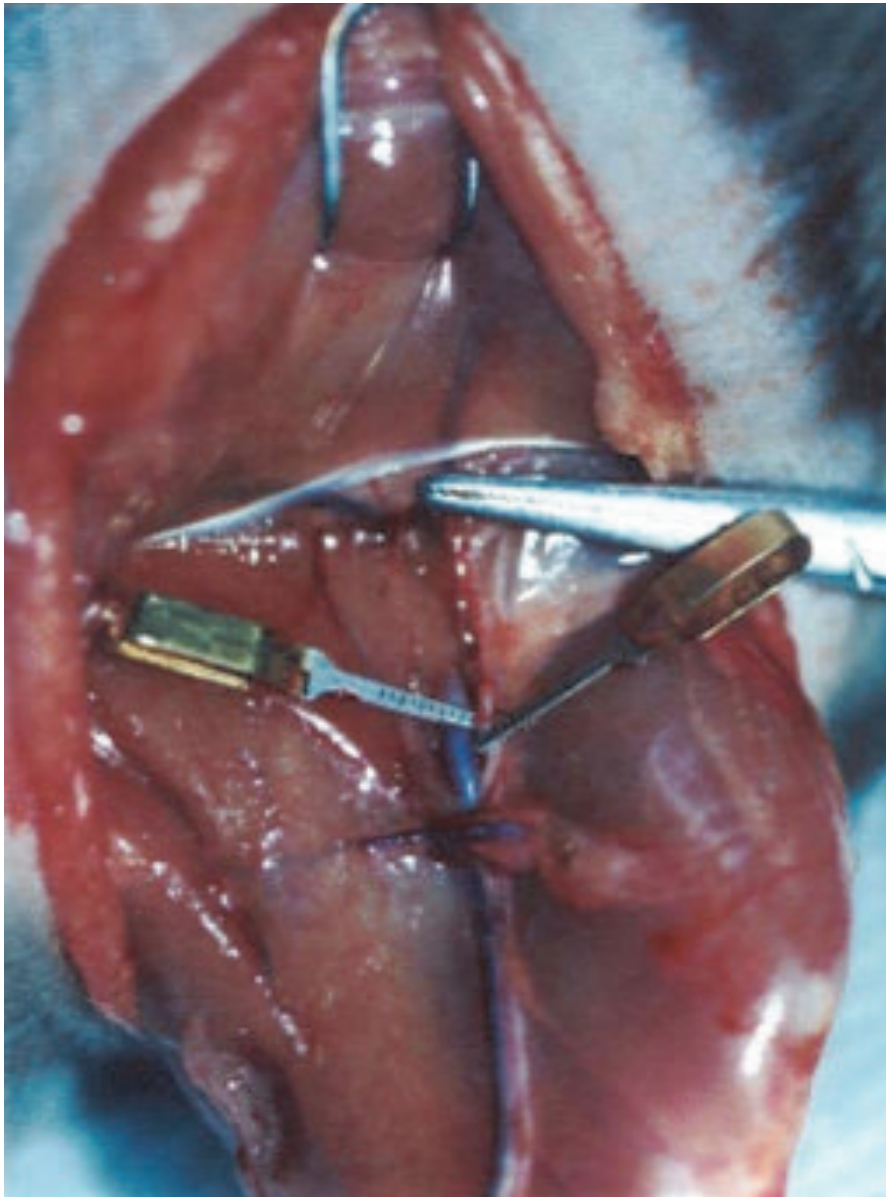


FIGURA 3 Ligadura dos vasos femorais do doador
(FERREIRA LM, 1994)

Os grupos musculares da coxa foram identificados e separados o mais próximo possível de suas origens tendinosas. Uma osteotomia a 90 graus foi realizada com uma serra óssea afiada e a pata foi liberada do animal doador.

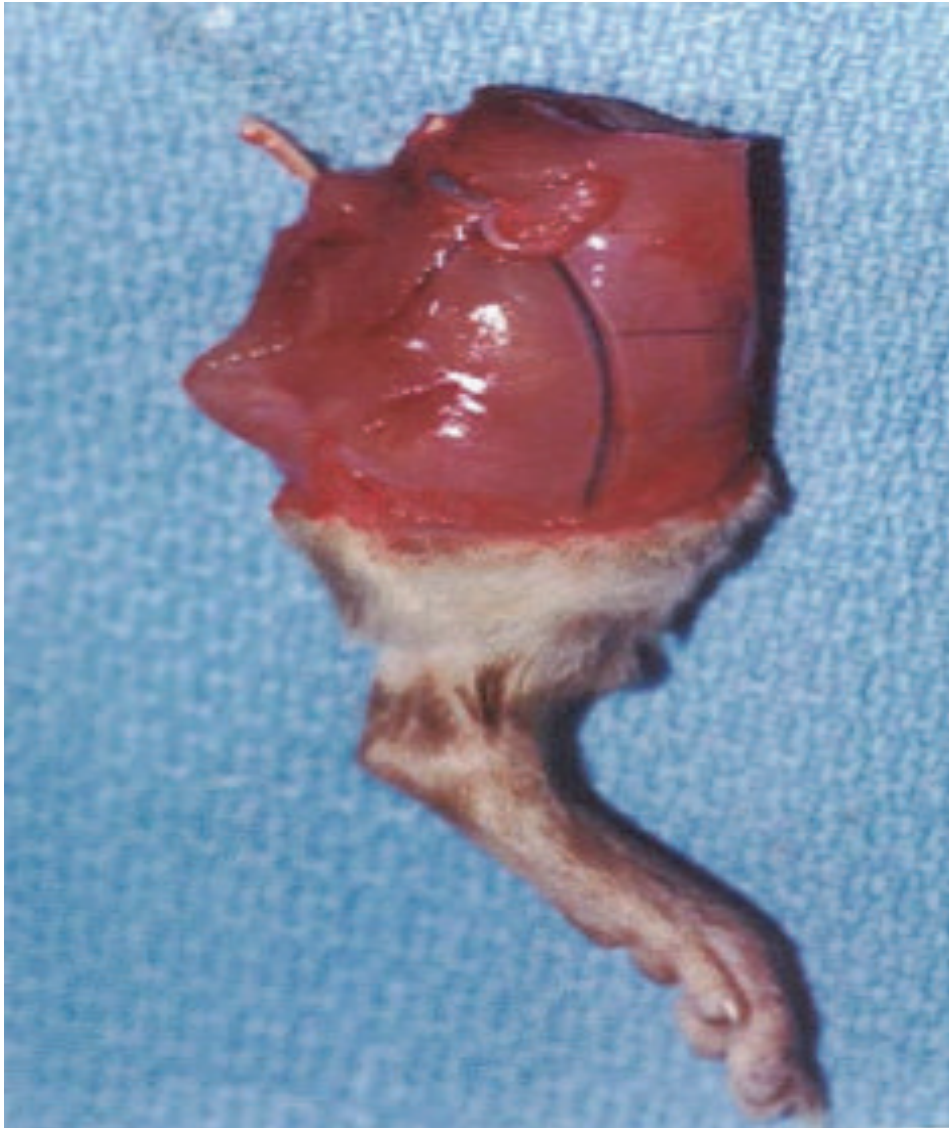


FIGURA 4 Pata do rato após ressecção (FERREIRA LM, 1994)

O transplante foi lavado com solução de ringer heparinizada (descrito acima) com uma seringa de 5ml acoplada a uma agulha de insulina que teve sua ponta partida para não traumatizar a parede do vaso. Através da introdução desta seringa pela luz da artéria femoral e com o auxílio do microscópio foi realizada lavagem do enxerto até a saída de líquido transparente pela luz da veia femoral. O enxerto foi então mantido

no refrigerador do laboratório a 4 °C, coberto com gase umedecida com Ringer Lactato até o momento do implante.

O procedimento cirúrgico para remover o membro do receptor foi similar ao procedimento realizado no doador, exceto pelo fato deste não ter sido lavado com solução de Ringer Lactato e heparina e todas as estrutura neurovasculares foram seccionadas o mais distal possível (proximal à proeminência dos vasos epigástricos inferiores) para permitir comprimento máximo para a realização das anastomoses necessárias.



FIGURA 5 Incisão circunferencial no membro do receptor

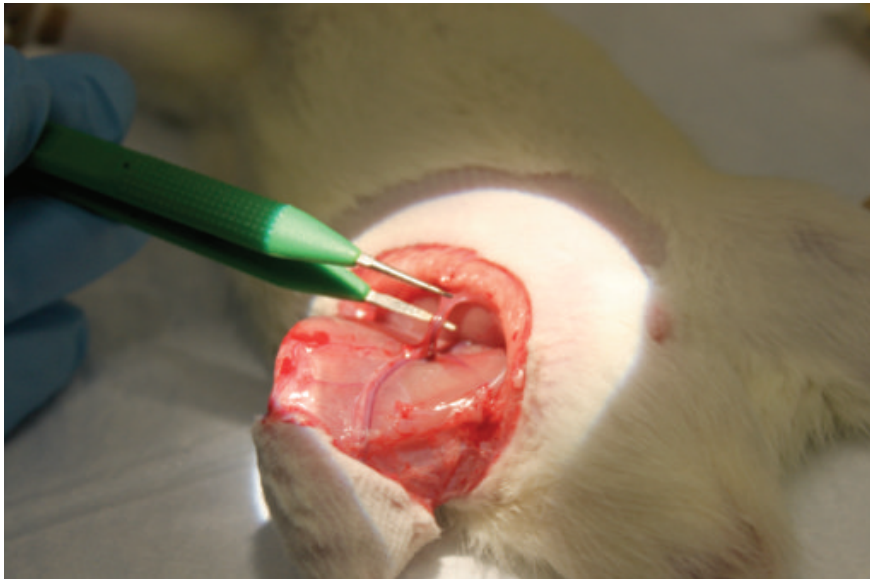


FIGURA 6 Dissecção e ligadura dos vasos epigástricos

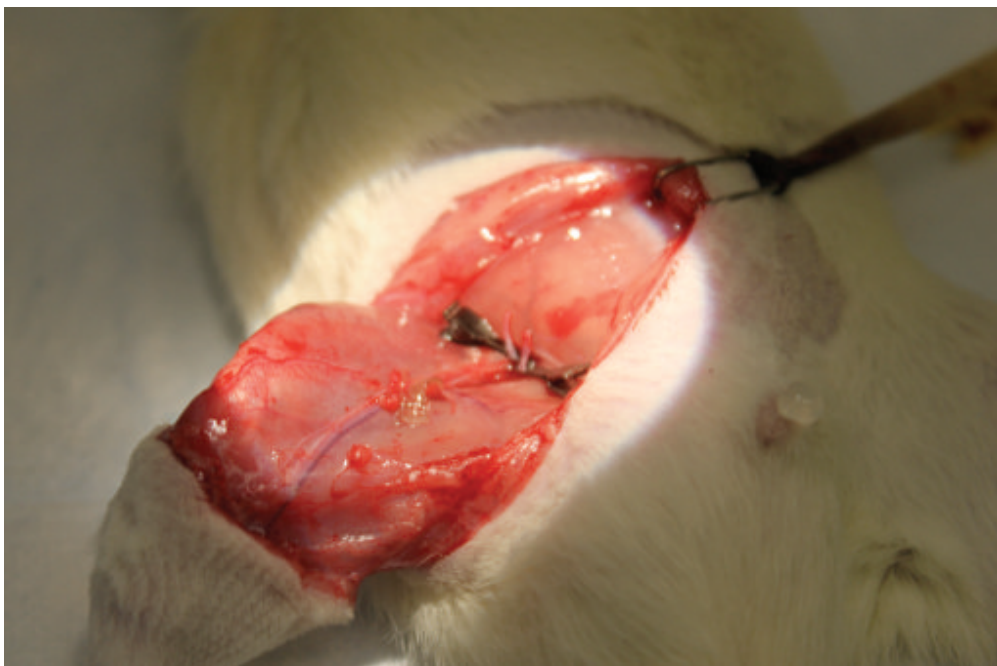


FIGURA 7 Ligadura dos vasos femorais proximal à proeminência dos vasos epigástricos



FIGURA 8 Secção da musculatura da coxa e osso femoral

O implante do alo transplante começa com a osteossíntese usando uma agulha de 18 gauge e fazendo o papel de haste intramedular. Músculos foram então suturados com pontos simples com Vycril 5-0 (Ethicon, USA).



FIGURA 9 Colocação de haste intramedular



FIGURA 10 Sutura da musculatura com pontos simples

A veia e a artéria femoral foram anastomosadas usando técnica microvascular padronizada com fios monofilamentados de nylon 10-0 (Ethicon Inc, St. Ângelo, TX, USA), usando clamp microcirúrgico número 1 com moldura. Para a realização da anastomose venosa foi utilizado o mesmo clamp microcirúrgico V1. Os primeiros dois pontos foram colocados nas laterais formando um ângulo de 180 graus, foram colocados quatro pontos simples na parede posterior e 4 na parede anterior que somados aos das laterais totalizaram dez.

Para a anastomose arterial foram realizados 8 pontos simples, sendo os dois primeiros laterais da mesma maneira que na anastomose venosa, estes foram usados para manter a artéria fixa na moldura.

Em seguida, foram realizados três pontos simples na parede posterior, sendo a anastomose finalizada com três pontos simples na parede anterior do vaso. Não foi realizado anastomose nervosa.

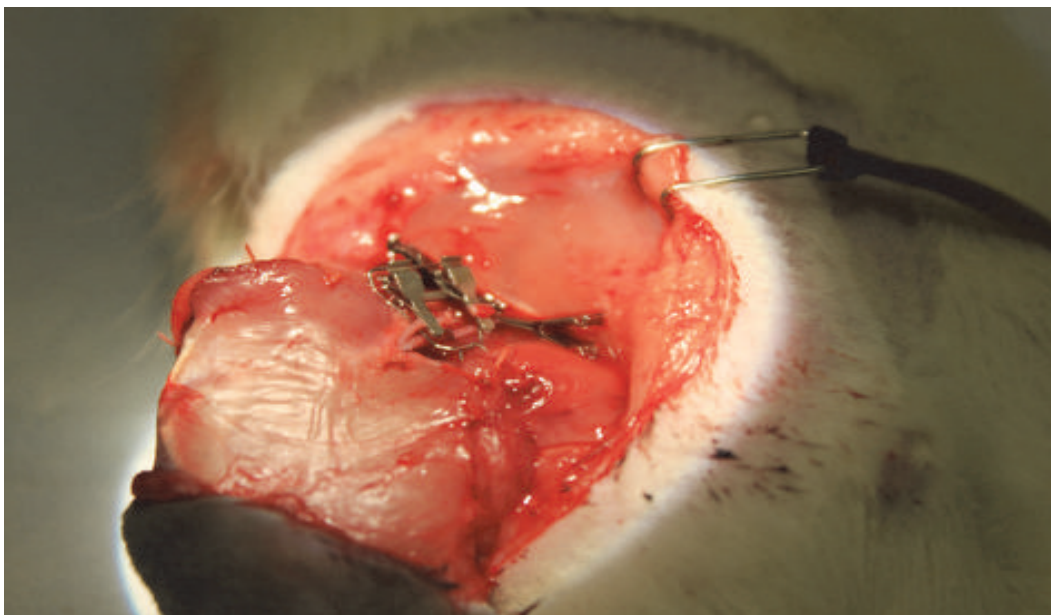


FIGURA 11 Artéria femoral fixa no clamp com veia já anastomosada

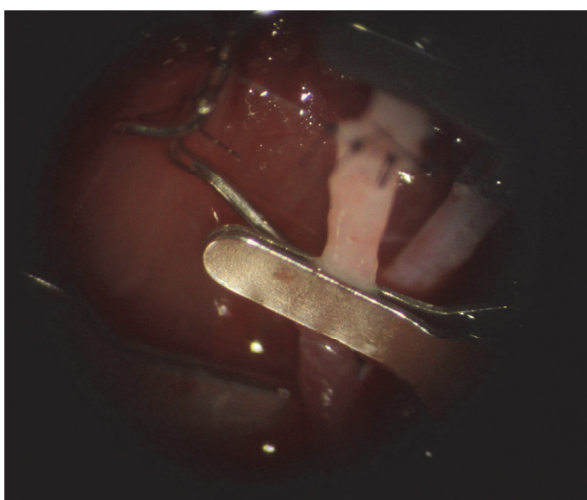


FIGURA 12 Anastomose arterial

No final das anastomoses foram retirados os clamps e checado quanto a existência de algum sangramento. Na ausência do mesmo foi realizado o fechamento da pele que foi suturada com pontos contínuos de fio Vycril 5-0 (Ethicon Inc, St. Ângelo, TX, USA).

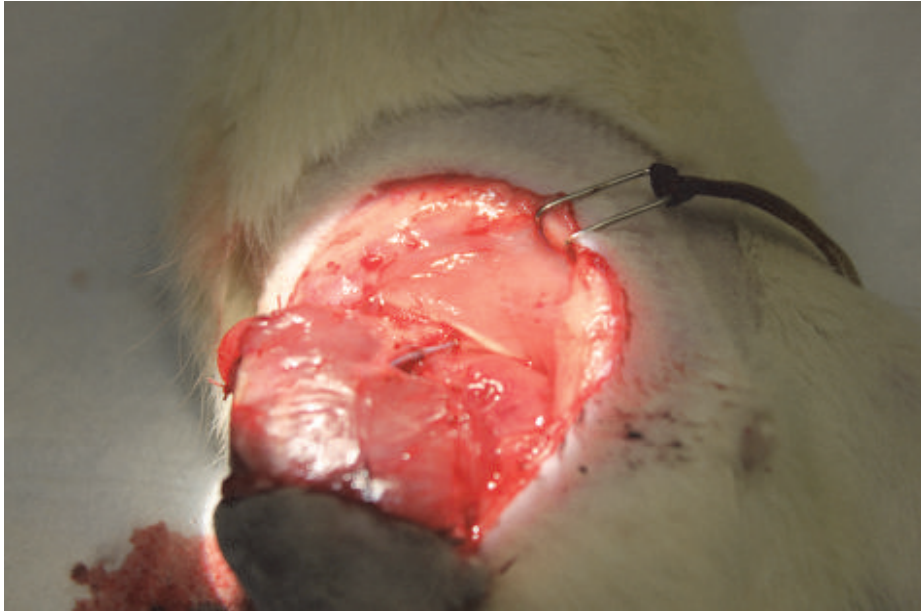


FIGURA 13 Após retirada dos clamps, revisão da hemostasia

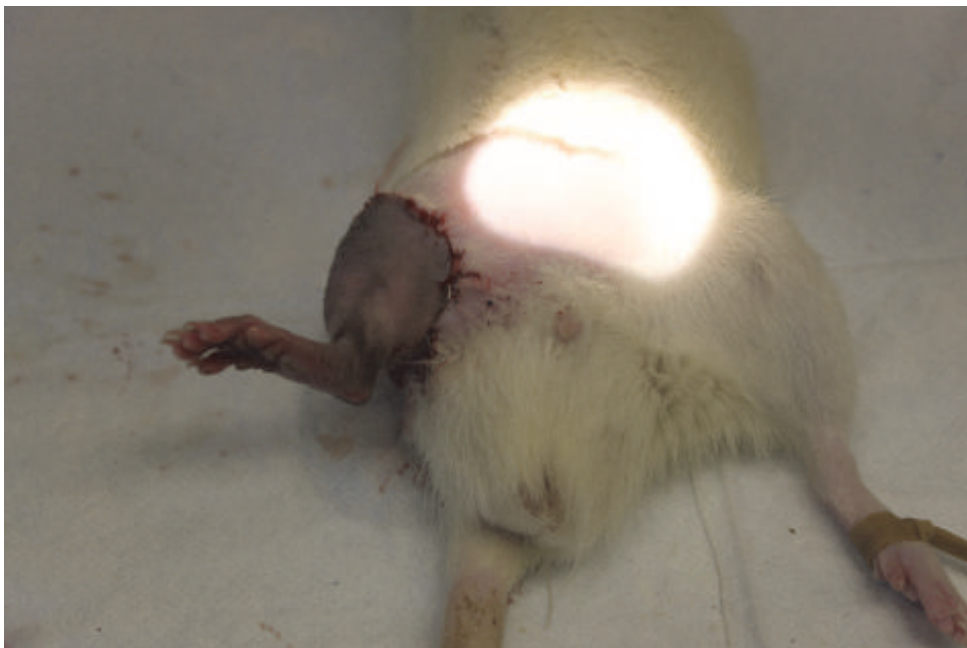


FIGURA 14 Pós-operatório imediato após fechamento da pele

Ao final do procedimento cirúrgico os ratos foram alocados em suas respectivas caixas para se recuperar da anestesia. Estas, por sua vez, foram

colocadas sobre uma placa térmica que mantinha a temperatura da caixa em 37 °C. Os animais eram mantidos assim e observados até estarem totalmente despertos. Os animais doadores sofriam eutanásia em uma câmara de CO₂ e, juntamente com os membros dos receptores, eram guardados em congelador previamente designado para esta função de onde eram removidos seguindo as regras de cuidados com animais de laboratório do NIH.

No pós-operatório, os ratos receptores receberam de imediato Buprenex (Buprenorfina) intra peritoneal 0,1mg/Kg (Reckitt Benckiser, Slough, UK) para alívio da dor e Baytril 5% (Enrofloxacin 50mg/ml) intra peritoneal 2,5ml/Kg (Bayer Healthcare AG, Monheim, Germany) para antibiótico profilaxia. Estas drogas foram mantidas por três dias.

A primeira dose do protocolo de imunossupressão também foi administrada no pós-operatório imediato.

DIAGNÓSTICO VISUAL DE REJEIÇÃO

O membro transplantado foi observado diariamente verificando sinais de rejeição (edema, mudança de cor e necrose de pele), segundo a classificação de BANFF (CENDALES *et al.*, 2008). O escore de critério visual foi usado para avaliar o grau de rejeição. Foi considerado rejeição do membro, grau 3 de rejeição.

Classificação de BANFF:

Grau 0 – sem sinais de rejeição

Grau 1 – hiperemia do membro

Grau 2 – hiperemia e edema do membro

Grau 3 – descamação da pele

Grau 4 – Mumificação do membro

TESTE DE TOLERÂNCIA

Os animais do grupo experimental que não apresentaram rejeição até o pós-operatório 120, foram submetidos a um teste de tolerância que consiste em um enxerto de pele de uma terceira parte. Estes animais foram submetidos a enxerto de pele de um animal da mesma raça do doador (Brown-Norway) e outro enxerto de uma terceira raça (Wistar Furth). Os animais verdadeiramente tolerantes rejeitaram o enxerto da terceira parte e ocorreu a integração da pele da raça do doador.

Dois animais, um da raça Brown-Norway e outro da raça Wistar Furth, foram anestesiados com 40mg/kg de pentobarbital sódico, foram submetidos à epilação com depilador elétrico em região abdominal e inguinal bilateral, marcação de diversos quadrados de 1cm de lado resultando 1 cm² (em média 1 rato pode ser doador de 6 enxertos). Foi realizada incisão sobre área marcada, retirado enxerto de pele e colocado em um frasco contendo soro fisiológico 0,9%.

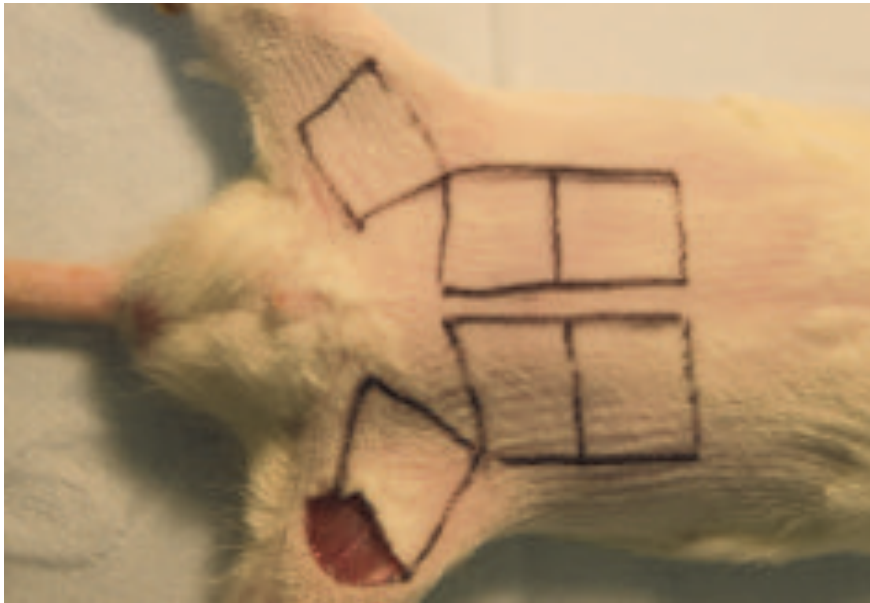


FIGURA 15 Marcação dos enxertos em rato Wistar-Furth



FIGURA 16 Marcação dos enxertos em rato Brown-Norway

Terminado a exérese dos enxertos, foi realizada anestesia nos animais receptores (PO 120 dias sem rejeição); dissecação de duas lojas de 1cm^2 simetricamente opostas na região lombar dos animais; colocação de enxerto de pele de Brown-Norway em uma das lojas e de Wistar-Furth em

outra; fixação com pontos simples de Vycril 5-0, colocação de curativo de Brown que consiste em uma gase raiom sobre o enxerto, seguido de gases e fixação do curativo à pele com pontos simples de Vycril 5-0.

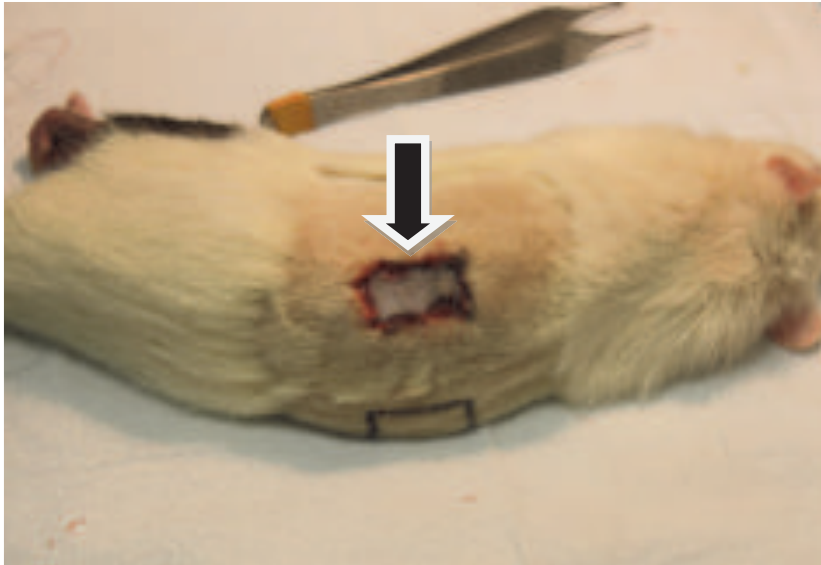


FIGURA 17 Dissecção da loja e fixação do enxerto de pele

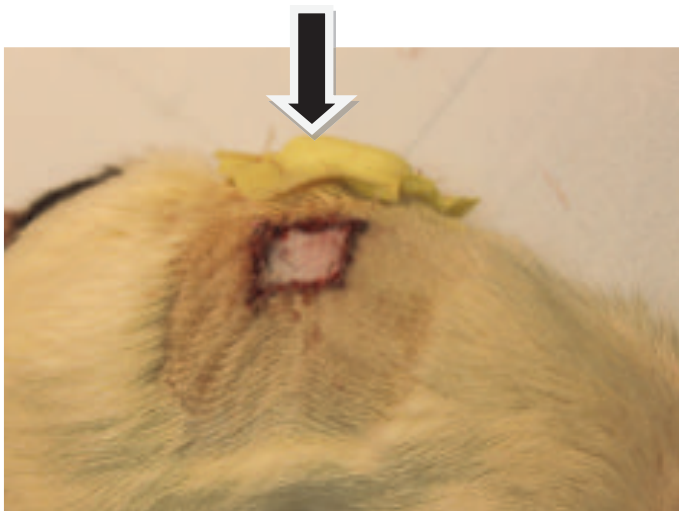


FIGURA 18 Fixação com curativos de Brown

São considerados tolerantes os animais em que ocorre o processo de rejeição do enxerto de terceira parte (Wistar-Furth), entretanto não há rejeição de enxerto da mesma raça que o doador (Brown Norway) após período de 30 dias da realização do enxerto (PO 150 da realização do transplante).

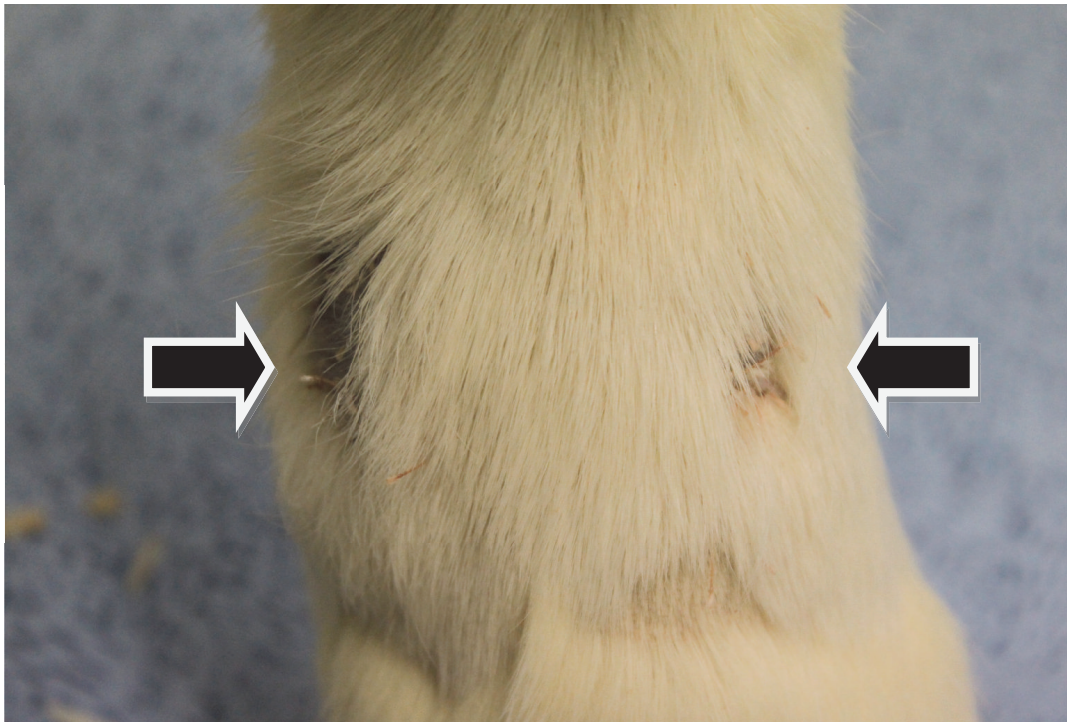


FIGURA 19 Aspecto do dorso de um animal submetido a teste de tolerância com o enxerto Brown-Norway (integrado) à esquerda e Wistar Furth (rejeitado) à direita PO 30 pós cirurgia de enxerto

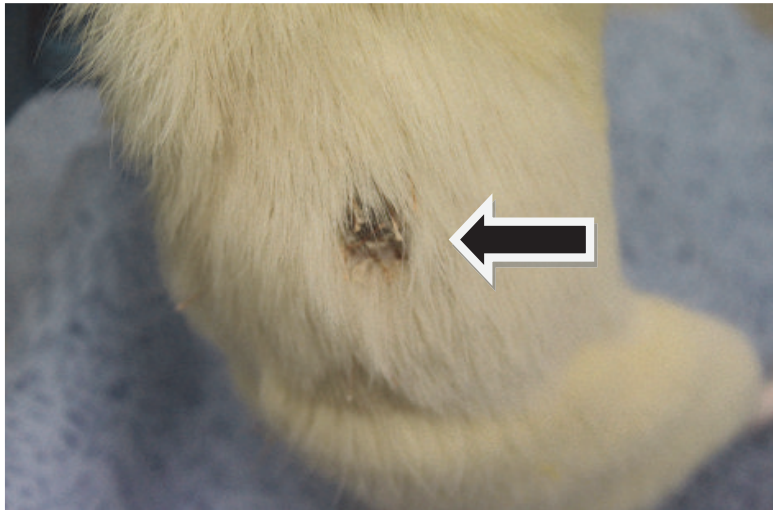


FIGURA 20 Enxerto WistarFurth com rejeição

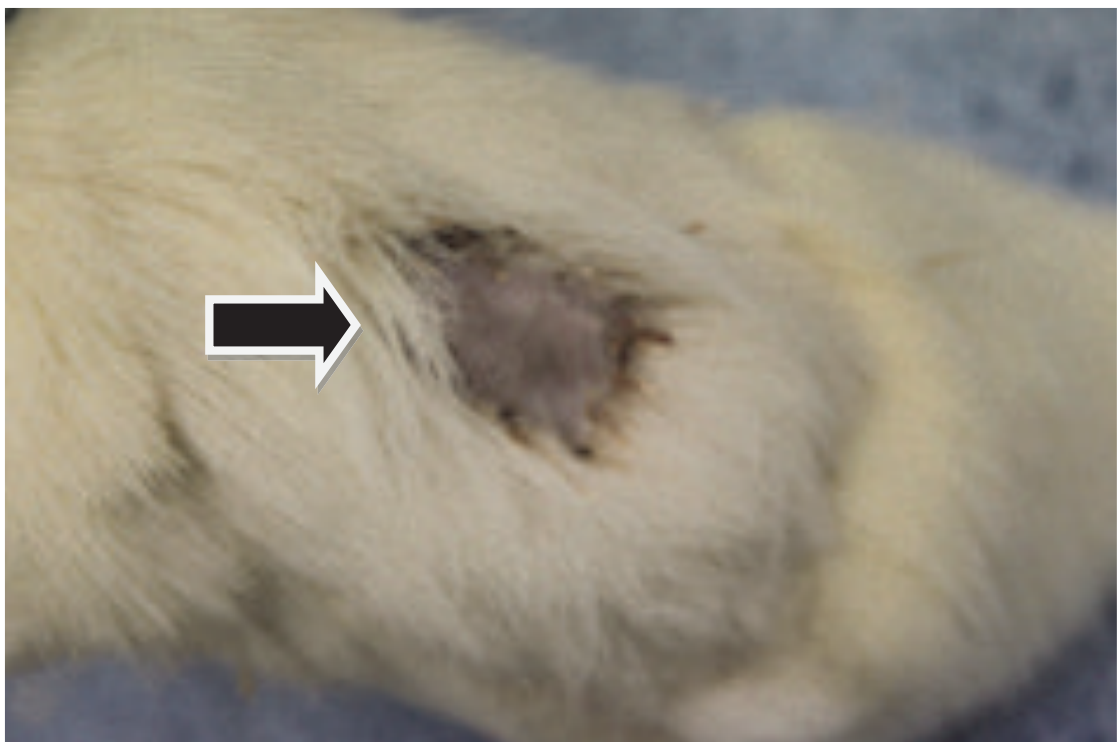


FIGURA 21 Enxerto de pele de Brown-Norway sem sinais de rejeição, com boa integração

COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE, PREPARAÇÃO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a realização da coleta de sangue com o objetivo de realizar a citometria de fluxo, os ratos foram alocados, um de cada vez, em plásticos desenhados exclusivamente para isto de forma cônica com um orifício em seu ápice para permitir a entrada de ar. O rato foi colocado com o focinho voltado para o ápice e anestesiado (Pentobarbital sódico 40mg/kg), a parte posterior voltada para a base que foi ocluída com um elástico fixado na base do rabo.

Realizou-se a secção do rabo na sua porção distal, deixando o sangue gotejar em um tubo com anticoagulante. Era coletado por volta de 500 μ L de sangue. O rabo do animal era então submetido à hemostasia com eletrocautério e o animal colocado de volta a sua caixa.

Os tubos com sangue foram transferidos para tubos de citometria de fluxo onde recebiam um acréscimo de solução tampão de fosfato 1x (PBS) (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) até completar 2mL, a isto se adicionava 1,5mL de Ficol (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Estes frascos foram centrifugados por 30 minutos a 400 G sem acionamento de frenagem ao final. Após este processo, as células brancas sobrenadantes eram aspiradas e passadas para outro tubo com 2 ml de meio completo, estes tubos eram então centrifugados por 5 minutos a 282 G.

Em seguida, foi feita a decantação deste tubo. As células foram ressuspensas em 150 μ L de PBS e depois separadas ao meio em dois poços de uma placa de 96 poços com fundo em V. A um destes poços foi adicionado uma solução de 47 μ L de PBS com 1 μ L de anticorpos:

AF488CD3 (BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA), PECD4 (BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA), PerCP CD8a (BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA) para marcação de CD3, CD4 e CD8. Ao outro foi adicionado solução com 48 µL de PBS com 1µL de anticorpos FITC CD4 (BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA) e PE CD25 (BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA).

Estas placas foram cobertas com folha de papel alumínio e armazenadas em câmara fria por 30 minutos. Após este período, acrescentou-se 70 µL de solução PBS, centrifugado a 2000 RPM e realizada a decantação. No frasco, com marcadores para CD3, CD4 e CD8, adicionou-se 200µL de formaldeído a 1% em PBS, realizou-se a mistura das células e transferido para tubos de citometria de fluxo, onde foi acrescentado mais 200µL de formaldeído a 1% em PBS e foi armazenado, coberto com folha de alumínio em câmara fria.

O frasco com marcadores para CD4/CD25 receberam 200µL, uma solução de ¼ concentrado de fixação/permeabilização para ¾ de diluente de fixação/permeabilização onde as células deste frasco eram misturadas.

Em seguida, esta placa foi guardada por 12 horas em câmara fria. Após este período, foi realizada a centrifugação a 2000 RPM e depois foi repetido este processo duas vezes com diluição em PBS. A seguir, foi diluído em solução com corante para FoxP3 (PerCPFoxP3, BD Pharmingen™, Sparks, MD, USA) e armazenado em câmara fria por 30 minutos, após este período foi realizada nova centrifugação a 2000 RPM, decantação e diluição final em tampão de citometria de fluxo, primeiro 200µL na placa e depois da transferência para o frasco de citometria de fluxo mais 200µL.

Todos os frascos foram então levados para a medição em citômetro de fluxo LSRII (BD Biosciences, Sparks, MD, USA).

Estas células foram avaliadas para expressão de diversos marcadores de superfície (CD3, CD4, CD8,CD25) ou marcadores intracelulares (FoxP3), usando um citômetro de fluxo LSRII (BD Biosciences). Dados foram analisados usando software FlowJo (Tree star).

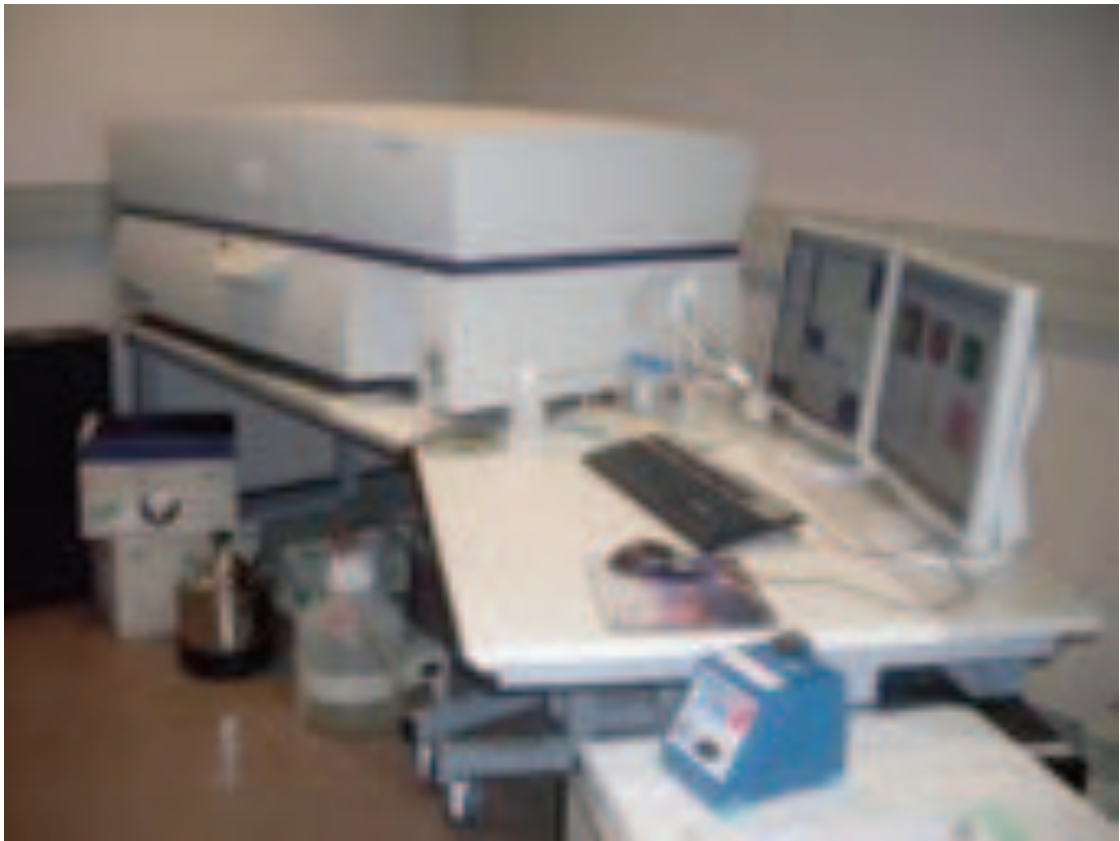


FIGURA 22 Citômetro de fluxo (*National research foundation equipment database*)

MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE IDO

As amostras de sangue para a medição da IDO foram coletadas no dia de pós-operatório 0, 5, 10, 15 e 21 da veia da cauda de 3 animais de cada grupo de estudo (1 experimental e 3 controle), submetidos à cirurgia de transplante com o intuito de, ao final do tratamento, identificar o mecanismo de ação. Coletou-se 500 μ L de sangue de cada animal e foram armazenados em tubos heparinizados. Estes tubos foram guardados em refrigerador a 4 °C por 5 minutos.

Após este prazo, foram retirados e seu conteúdo transferido para tubos tipo Eppendorf e submetidos a 7 minutos de centrifugação em centrífuga de bancada a 5000 RPM. Após a centrifugação, foram colhidos 200 μ L de soro sobrenadante e armazenados em tubo Eppendorf de 1,5ml.

As amostras foram então congeladas a -20 °C. Em momento oportuno, foram empacotadas em caixa com material isolante (isopor) com gelo seco e enviadas à Divisão de Biologia Química, *Biocenter*, da Universidade Médica de Innsbruck, na Áustria. Lá os níveis dos metabólitos da ação da IDO sobre o triptofano sérico foram medidos, seguindo os critérios do seguinte protocolo.

As concentrações de triptofano e kinurenina foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão fase reversa (HPLC), seguida de precipitação de proteína com ácido tricloro acético. O triptofano foi medido por seu nível de fluorescência nativo ao comprimento de onda de estimulação de 285nm e de comprimento de onda de emissão de 365nm.

A kinurenina foi detectada por absorção UV a um comprimento de onda de 360nm no mesmo sistema cromatográfico. Finalmente, a razão entre a kinurenina e o triptofano (kyn/trp) foi calculada dividindo as

concentrações de kinurenina (nmol/L) pelas concentrações de triptofano (nmol/L).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores são expressos em média com desvio padrão. A análise para diferenças estatisticamente significantes foram realizadas usando teste T de student e teste ANOVA.

A influência de diferentes tratamentos na sobrevida do alotransplante foi analisada usando teste Log-Rank. Foi considerado significativo $P < 0,05$.

Foi usado o software SPSS.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Não houve perda dos membros transplantados entre os grupos avaliados, dois animais do grupo controle que receberam tratamento exclusivo com rapamicina durante 21 dias (R21). Este dado vem corroborar com estudos anteriores que demonstram a baixa perda de retalhos nesse tipo de procedimento (FERREIRA *et al.*, 1995).

Do grupo experimental:

QUADRO 3 Rejeição grupo experimental:	
Ratos	Dia de rejeição
FK7R14-1	tolerante
FK7R14-2	tolerante
FK7R14-3	tolerante
FK7R14-4	PO 205
FK7R14-5	PO 35
FK7R14-6	PO 35

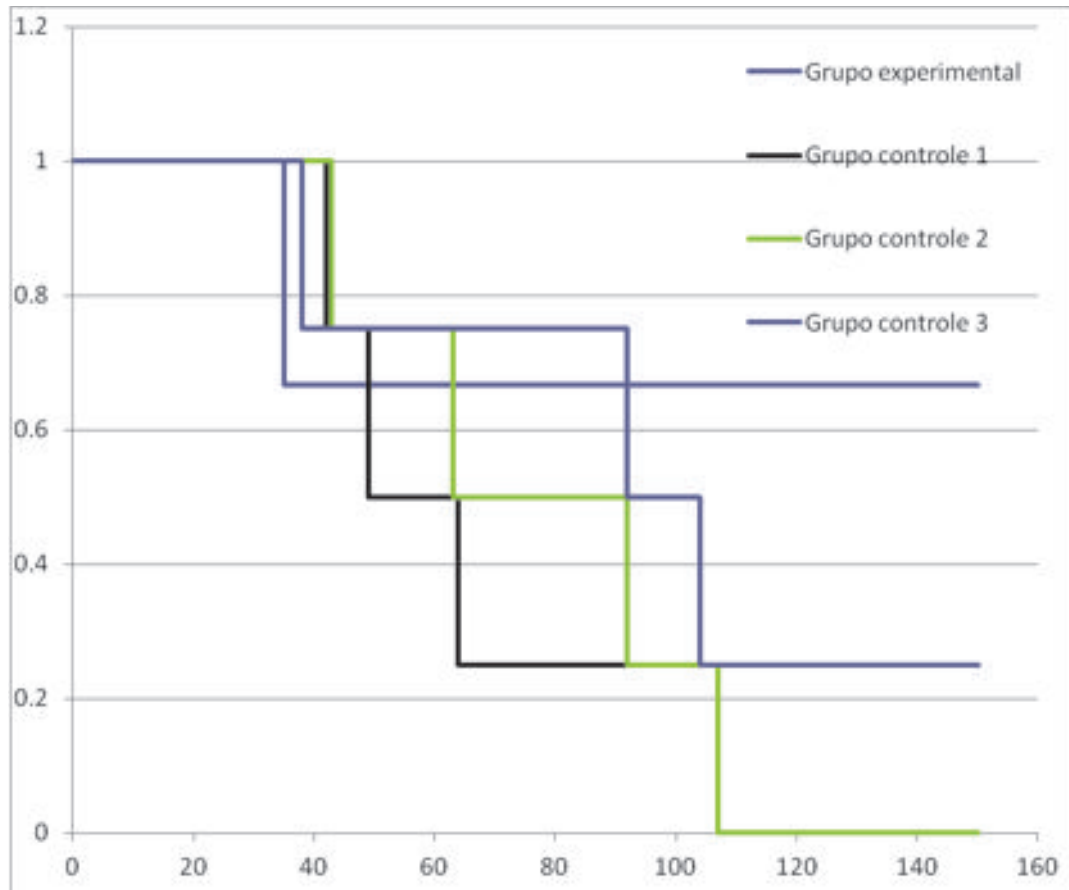
QUADRO 4 Rejeição grupo 1	
Ratos	Dia de rejeição
FK21-1	PO 42
FK21-2	PO 49
FK21-3	PO 64
FK21-4	PO 236

QUADRO 5 Rejeição grupo 2	
Ratos	Dia de rejeição
R21-1	PO 92
R21-2	PO 65
R21-3	PO 45
R21-4	PO 107

QUADRO 6 Rejeição grupo 3	
Ratos	Dia de rejeição
FK21R21-1	Sem rejeição
FK21R21-2	PO 92
FK21R21-3	PO 104
FK21R21-4	PO 38

Após 150 dias da realização do transplante, no grupo experimental não havia ocorrido rejeição em 66% dos animais. Já no grupo que recebeu exclusivamente tacrolimus houve 75% de rejeição (grupo controle 1). Dos animais que receberam exclusivamente rapamycina 100% havia rejeitado (grupo controle 2) e dos animais que receberam concomitantemente tacrolimus e rapamycina ocorreu 75% de rejeição.

Foi observado que, nos três grupo controle houve rejeição de 100% dos transplantes, após este período, e no grupo experimental houve rejeição, levando ao número final de 50% de indivíduos efetivamente tolerantes.



Kaplan –Meyer log rank $P = 0,475$

FIGURA 23 Gráfico de curva de sobrevida dos transplantes PO 150

Do grupo experimental 50% dos indivíduos se apresentaram efetivamente tolerantes. Foram então selecionados os valores obtidos nas medições por citometria de fluxo desses animais e comparados. Observou-se um aumento significativo dos níveis de FoxP3 entre o final do protocolo de imunossupressão (PO 21) e o PO 45, o que em última análise representa um aumento significativo das células T regulatórias.

QUADRO 7 Níveis de FoxP3 em ratos tolerantes (em % de células):

Ratos tolerantes	Pós-operatório 21	Pós-operatório 45
FK7R14-1	1,66	5,2
FK7R14-2	0,69	5,66
FK7R14-3	1,81	7,52

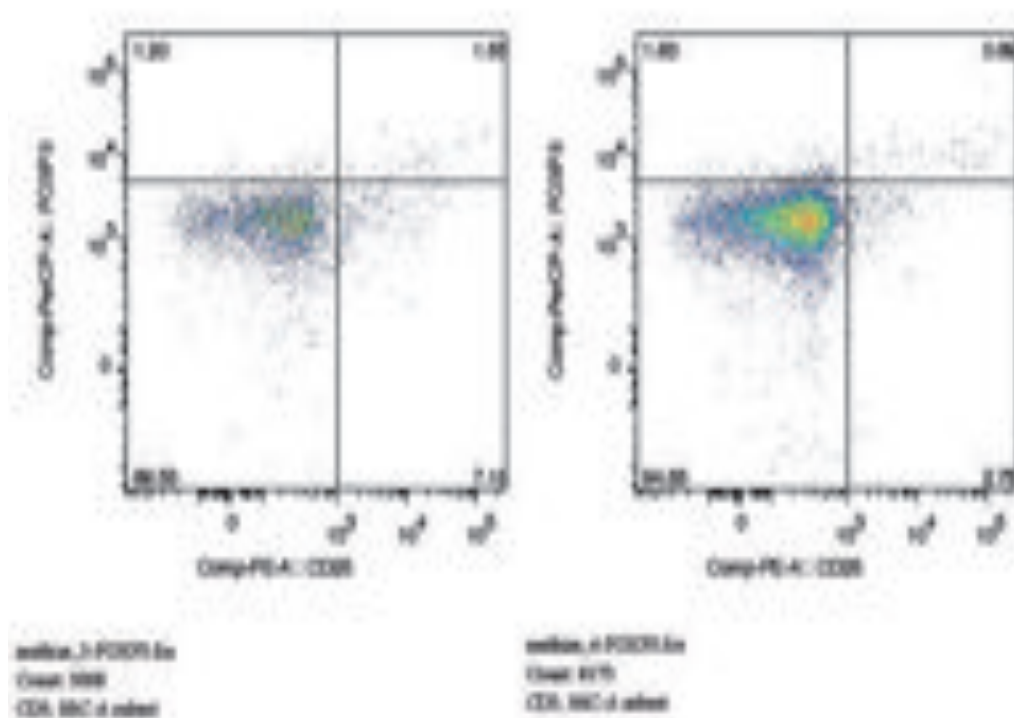


FIGURA 24 Resultados citometria de fluxo FoxP3 ratos 1 e 2 grupo experimental no PO 21

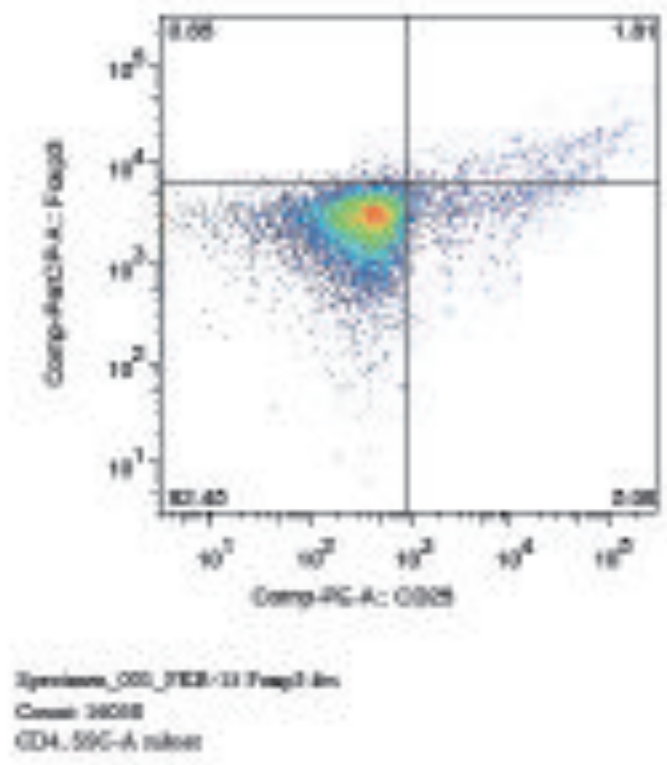


FIGURA 25 Resultado citometria de flujo rato 3 grupo experimental PO 21

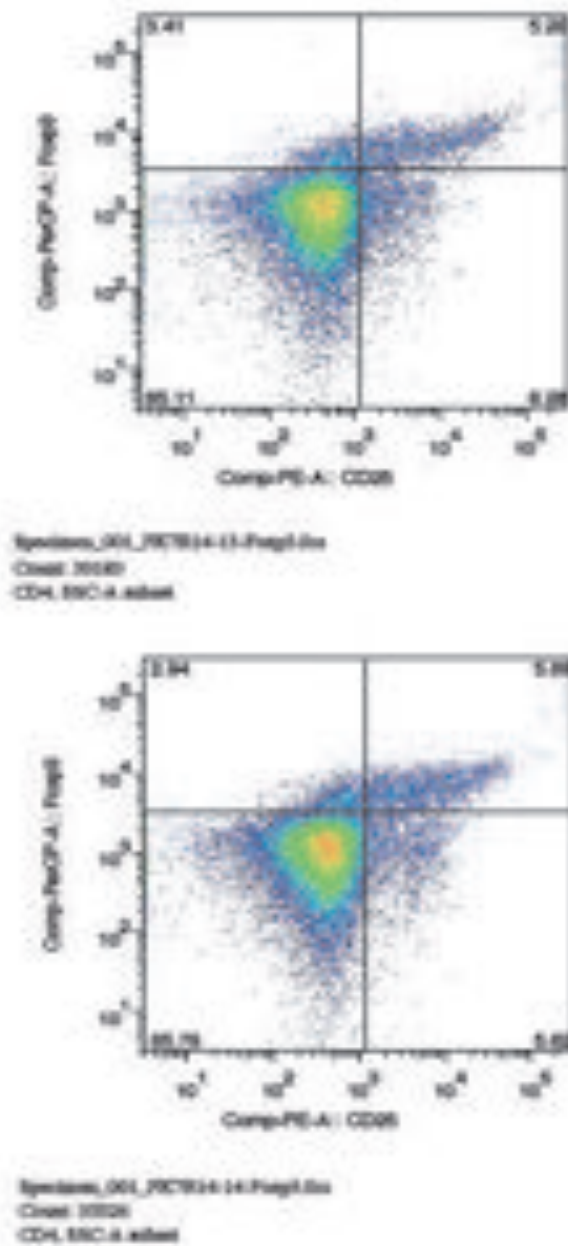
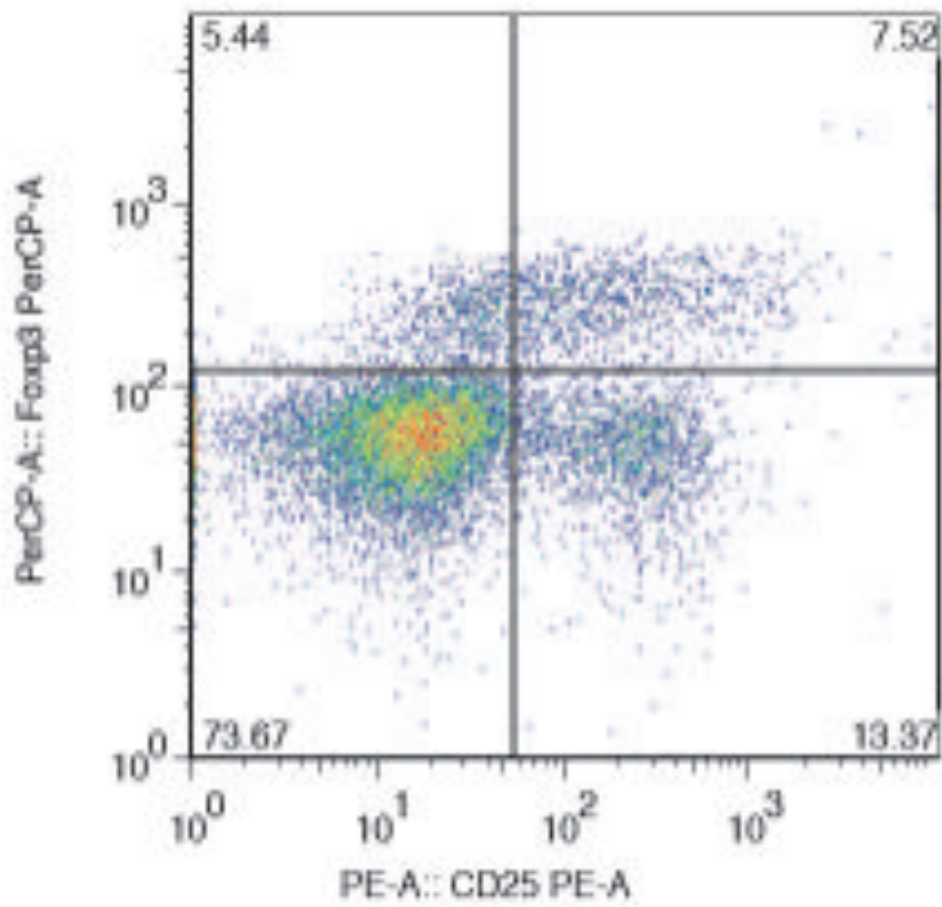


FIGURA 26 Resultado citometria de flujo ratio 1 e 2 grupo experimental PO 45



Matthias 15-Foxp3.fes

Count: 11365

CD4 GFP-A subset

FIGURA 27 Resultado citometria de fluxo rato 3 grupo experimental PO 45:

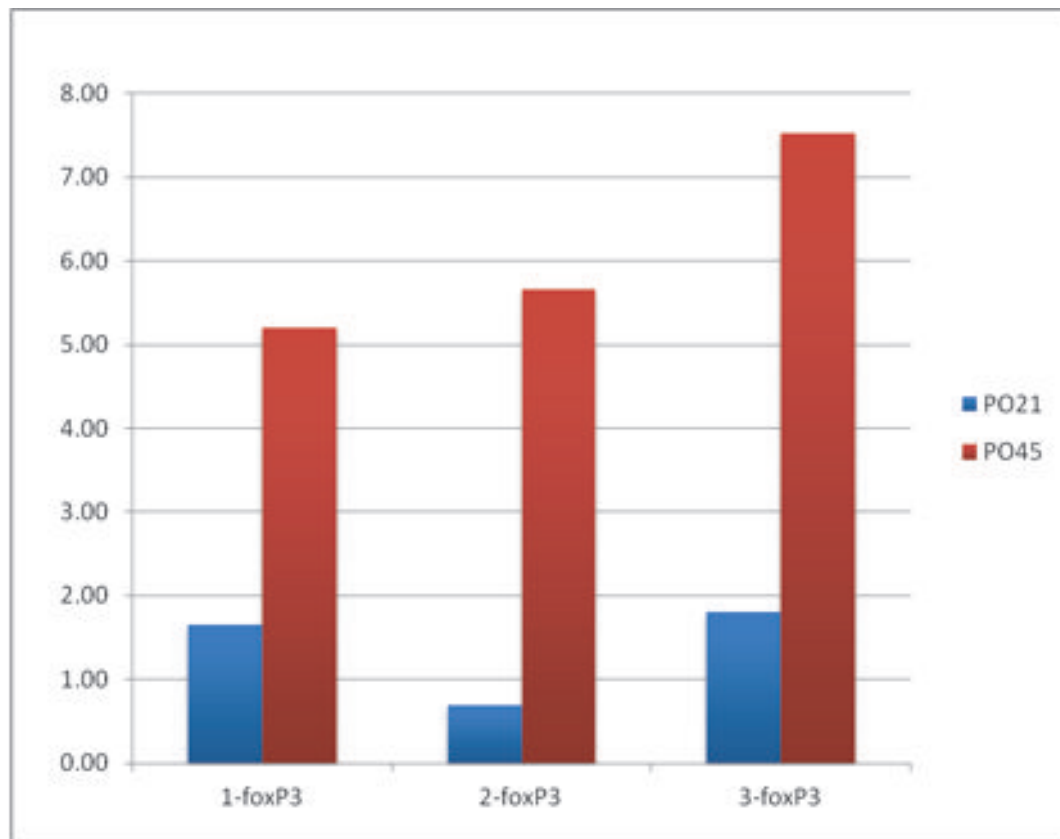
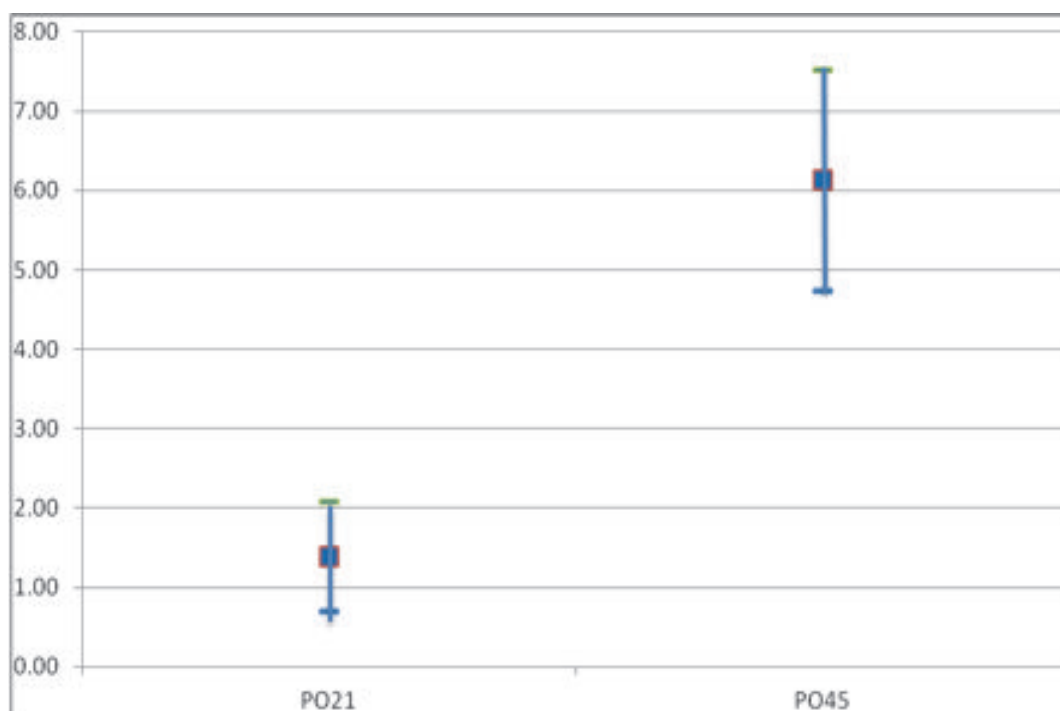
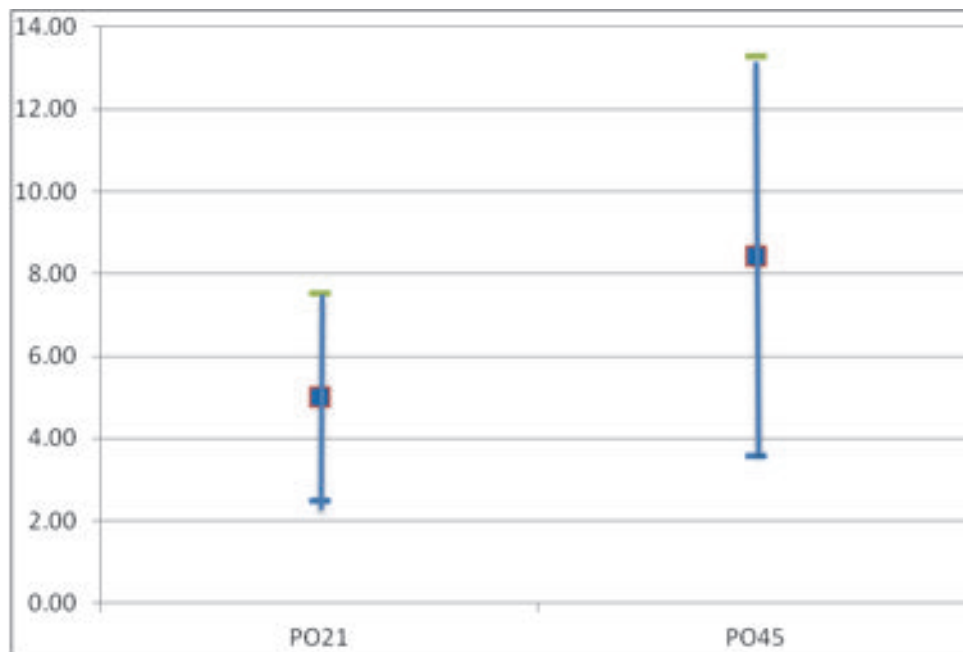


FIGURA 28 Gráfico dos níveis de FoxP3 dos ratos tolerantes em %



Teste T de student: $P = 0,018$

FIGURA 29 Média dos níveis de FoxP3 em %:



Teste T student P: 0,328

FIGURA 30 Média dos níveis de CD4+CD25+, PO 21 e PO45

No experimento 2, animais recebendo o mesmo protocolo experimental e com grupos controle semelhante ao experimento 1 foram submetidos à coleta de amostras de sangue e submetidos à citometria de fluxo. Os mesmos parâmetros foram avaliados com o intuito de comparação dos valores entre grupo experimental e seus controles.

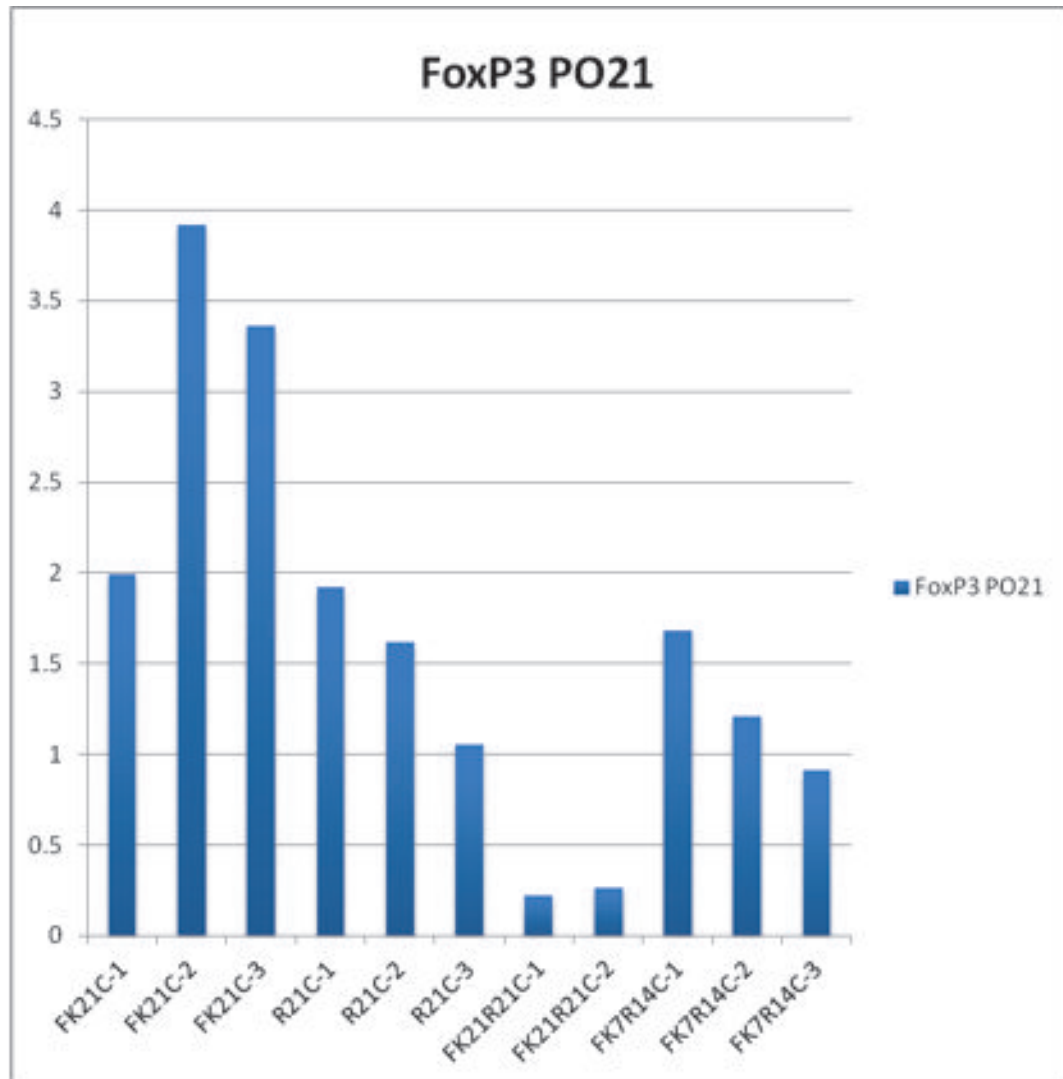
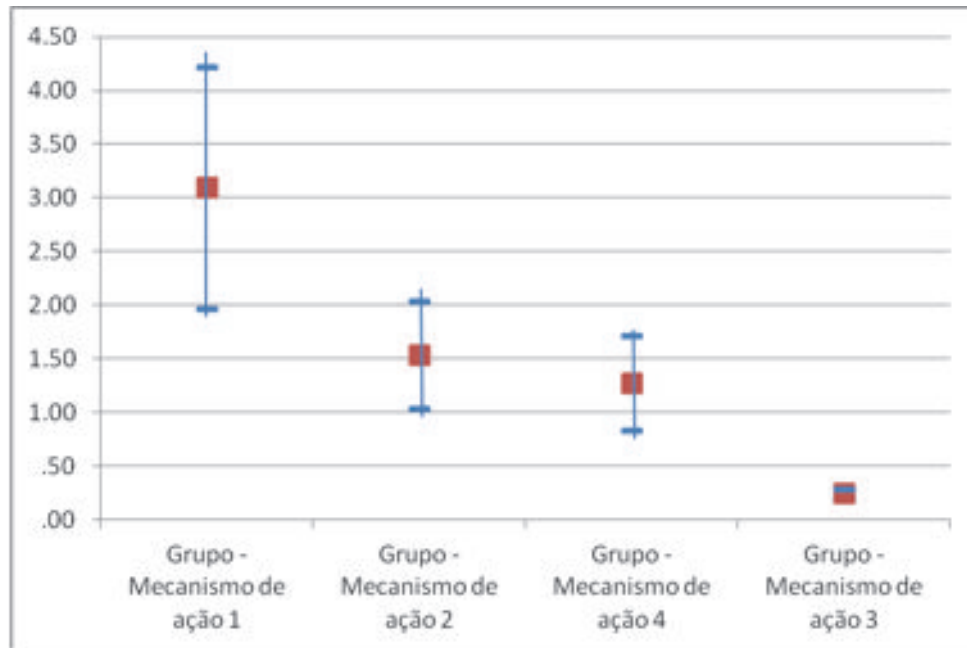


FIGURA 31 Níveis de FoxP3 coletado no PO 21 experimento 2 em %

Quando comparados os níveis de FoxP3 ao PO 21 entre os grupos estudados, verificou-se um aumento significativo do grupo recebendo exclusivamente tacrolimus.

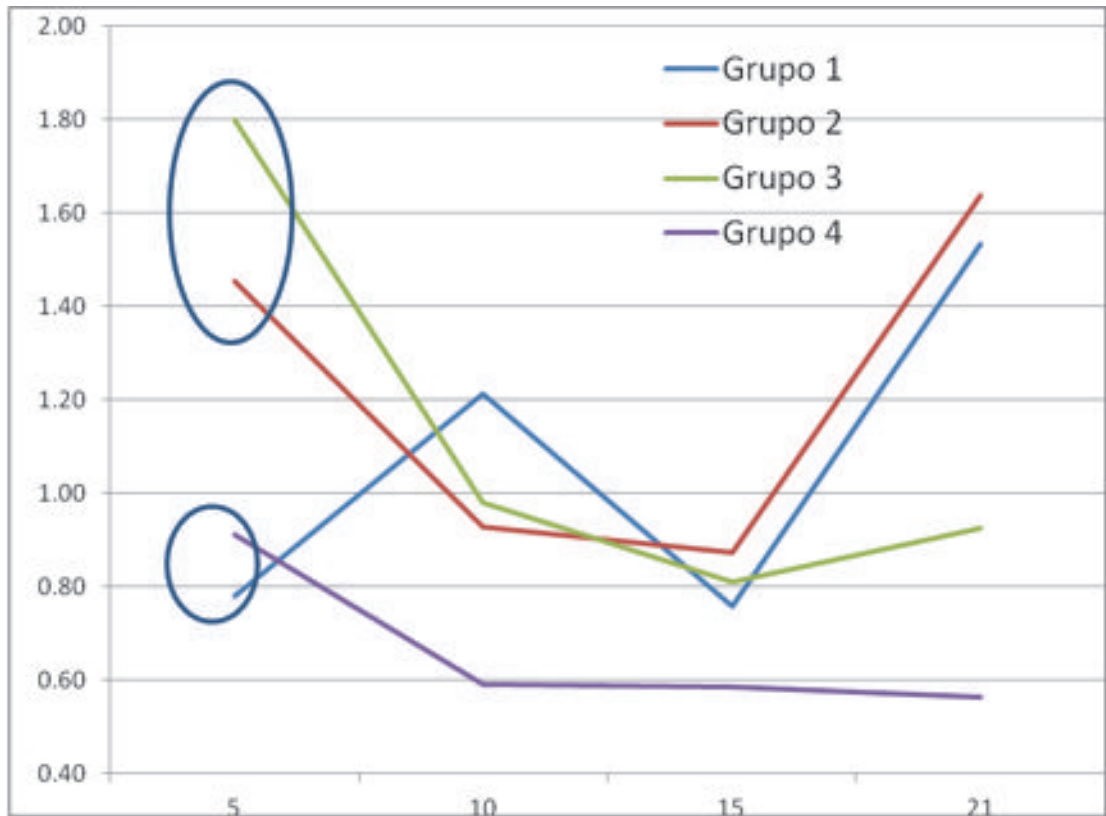


ANOVA $P = 0,008$ (para grupo FK21)

FIGURA 32 Média dos níveis de FoxP3 experimento 2 em %:

No experimento 2 foi coletado sangue ao PO 0, 5, 10, 15, 21 com o intuito de medir os níveis de triptofano e dos produtos da sua metabolização pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que, em última análise representa o nível de atividade desta enzima.

Observou-se um nível significativamente baixo da kinurenina sérica (em $\mu\text{Mol/L}$) em indivíduos do grupo 1 (recebendo exclusivamente tacrolimus) em relação aos outros no PO 5, demonstrando um nível baixo de atividade da IDO. A kinurenina é um metabólito resultante da ação da IDO sobre o triptofano, seu nível baixo demonstra baixa atividade da IDO nestes casos.



ANOVA: 0,015 KYN , T: 5 dias

FIGURA 33 Gráfico dos níveis de kinurenina sérica no período entre PO 0 e PO 21 em $\mu\text{Mol/L}$:

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Desde o início da realização de transplantes, seja para a substituição de órgãos doentes (transplantes sólidos), seja no transplante alógeno de tecido composto, o processo de rejeição e a necessidade do uso contínuo de altas doses de drogas imunossupressoras isoladas ou em associação com consequentes efeitos colaterais tem sido o maior obstáculo no emprego desta terapia. Também é um fator limitante na qualidade de vida dos pacientes, especialmente nos indivíduos submetidos a transplantes de tecido composto alógeno, pois eles não têm uma doença que coloca a vida em risco, mas apresentam uma deformidade que limita as atividades do dia a dia ou sua inserção social (MADANI *et al* 2008).

Em meados da década de 90, em trabalhos experimentais, notou-se que é possível a associação de drogas imunossupressoras com sucesso terapêutico e diminuição de seus efeitos colaterais (FERREIRA LM *et al* 1994, FERREIRA LM *et al* 1995, BENHAIM *et al* 1996, KAHAN 1998, KHANNA 2000). Isto se viu de base para os protocolos utilizados nos transplantes alógenos de tecido composto realizados *a posteriori*.

Desde o transplante de mão realizado por Gilbert em 1998, esses protocolos são basicamente compostos por indução com anticorpos policlonais, um inibidor da calcineurina, micofenolato mofetil e corticoides, com terapia de manutenção com inibidor da calcineurina, micofenolato mofetil e corticoides, com resultados animadores, mas não inócuos. Dentre os problemas encontrados estavam episódios de rejeição aguda, infecções oportunistas e efeitos colaterais próprios das drogas

utilizadas (DUBBERNARD *et al*, 1999; KANITAKIS *et al*, 2003; LEVI *et al*, 2003; PETIT *et al*, 2003; LANZETTA *et al*, 2005; PETRUZZO *et al*, 2006; SHUIND *et al*, 2006; LANZETTA *et al*, 2007; BONATTI 2009; JABLECKI *et al*, 2009).

Isto estimulou os pesquisadores a irem atrás do “Santo Graal” do transplante que é a tolerância. Diversas vias da cascata autoimune foram estudadas e novas terapias e protocolos descritos. Nesta mistura de estudos, percebeu-se que o controle/bloqueio de células T CD4+ e CD+ poderia induzir à tolerância (SCULLY *et al*, 1994; COBBOLD *et al*, 1996). Na realidade, o uso de anticorpos para bloquear estes receptores de membrana permitiu que células CD4+CD25+ tivessem sua função estabelecida e se comprovou que elas induziam mecanismos tolerogênicos (SAKAGUCHI *et al*, 1995; KINGSLEY *et al*, 2002; GRAÇA *et al*, 2002; GRAÇA *et al*, 2004). Também foi demonstrado que estas células executavam sua função através de uma enzima de origem intracelular denominada FoxP3. No estudo aqui realizado foi observado, em ratos tolerantes, níveis semelhantes de CD25 entre o PO21 e PO45, entretanto nesse mesmo grupo, durante o mesmo período, houve um aumento da FoxP3.

Estudos sobre o mecanismo de ação das drogas imunossupressoras mostraram que a rapamycina tinha seu principal efeito não no bloqueio de uma enzima chamada interleucina-2, mas sim na sua sinalização (SEHGAL 2003), o que a princípio não limitaria todas as suas funções.

A indução da tolerância passaria por dois estágios, sendo o primeiro a depleção de células T efetoras e a segunda o estímulo de T reguladoras. (TAYEB *et al*, 2007)

Este foi o princípio adotado neste estudo. Procurou-se adotar uma associação de terapia de controle das células T efetoras com o uso de soro antilinfócitos e tacrolimus com o uso de uma droga que permitisse a ação da interleucina 2 na ativação de células T reguladoras.

YONG *et al.* (2007) evidenciaram que a interleucina 2 (IL-2) é crucial para a geração, a expansão, a sobrevivência e a função das células T reguladoras e tem mostrado, em estudos experimentais, para a sobrevida de longo prazo do enxerto. Baixas doses de IL-2 modulam seletivamente células T reg e aumentam expressão de FoxP3 *in vivo*. Inibidores da calcineurina evitam rejeição ao bloquear a transcrição do gene da IL-2.

Experimentalmente, altas doses de inibidores da calcineurina no momento da indução da tolerância pode evitar sobrevivência longa do transplante e o desenvolvimento de T reguladoras. Embora não se tenha avaliado os níveis de IL-2 neste estudo, procurou-se evitar o uso de altas doses de inibidor da calcineurina, substituindo-o por rapamicina, tentando preservar a ação da IL-2 sobre as células reguladoras.

ZHENG *et al.* (2003), levando em consideração a importância da IL-2 na ativação das células T, procuraram modular a ação das células T reativas e T reguladoras com o objetivo de alcançar sobrevida longa a diversos tipos de transplante. Para tal usaram uma proteína agonista da IL-2 (IL-2/Fc) e uma proteína mutante antagonista da interleucina 15 (IL-15) (mIL-15/Fc).

A IL-15 é importante em mecanismos citotóxicos. Eles as associaram em diferentes protocolos terapêuticos, inclusive utilizando rapamicina com o objetivo de antagonizar o processo de proliferação das

células T ativado por fatores de crescimento sem comprometer a ativação de morte celular induzida que é desencadeada pela IL-2.

Uma das preocupações foi se a introdução de IL-2/Fc+/+, potencialmente citolítica, poderia destruir as cadeias imunoregulatórias. Para tal foi administrado em ratos não sensibilizados a IL-2/Fc +/+ e em outro grupo anticorpo anti-CD25 mAb (PC61). Enquanto o anti-CD25mAb eliminou as células CD4/CD25, a administração de IL-2/Fc não causou nenhuma alteração nos níveis desta células.

Nesse mesmo estudo, ao administrarem a combinação de IL-2/Fc+/+, mIL-15/Fc+/+ e rapamicina foi observado longa sobrevivência de transplantes de ilhotas em camundongos NOD com diabetes autoimune e sobrevida indefinida em camundongos IL-2KO C57BL/6 (H-2b).

Nesse experimento, os autores demonstraram que a rapamicina não impede a ação da IL-2 sobre as células reguladoras. Isto serviu para a decisão de utilizar rapamicina após o tacrolimus neste trabalho, procurando influenciar as células reguladoras.

Para avaliar se seu protocolo poderia não somente prolongar a sobrevida do transplante como também induzir à tolerância específica ao doador, eles realizaram um transplante de terceira parte e um secundário de mesmo doador.

O transplante secundário foi aceito, mas não o de terceira parte e, finalmente, para avaliar se as células CD-4+/CD25+ tinham um papel na indução da tolerância foram escolhidos indivíduos previamente tolerantes e realizado depleção de células Treg com anticorpo anti-CD25 com posterior transplante de pele. Todos os indivíduos rejeitaram, demonstrando que a modulação de células reguladoras é importante para se alcançar tolerância.

No estudo realizado aqui estudo não foram medidos os níveis de IL-2. Não foi possível comprovar se foi por ação dela que houve o aumento das células T reguladoras.

Pôde-se inferir isto apenas pelos dados obtidos na literatura. Entretanto, avaliou-se, antes, se o protocolo era capaz de levar a tolerância, apesar de ter apresentado um nível de sobrevida acima de 150 dias compatível com a literatura, nível 60%, e um número de animais tolerantes maior que nos grupos usados para comparação. Este valor não foi estatisticamente significativo provavelmente devido à perda precoce de dois ratos do grupo experimental, que apresentaram rejeição antes do PO 40.

Além disso, também se pretendia estabelecer uma ligação entre a terapêutica e o processo de tolerância, e procurar avaliar os processos que poderiam nos guiar na pesquisa do mecanismo de ação. Procurou-se investigar o comportamento das células T reguladoras e da IDO, uma enzima ligada a mecanismos regulatórios.

Em trabalho de DEMIRKIAN *et al.* (2006) foi demonstrado que, após transplante de fígado em humanos, houve uma redução expressiva de células T reguladoras. Entretanto, pacientes que apresentaram episódios de rejeição aguda nos primeiros três meses do pós-transplante apresentaram níveis de células T reguladoras significativamente inferiores que aqueles que não apresentaram rejeição aguda. Estes apresentavam níveis de FoxP3 superiores aos outros.

Eles mostraram também que a ação supressora das células T reguladoras era semelhante em indivíduos com rejeição em comparação com os que não sofreram tais episódios. Entretanto, a quantidade de T reg era três vezes maior nos que não sofreram episódio de rejeição.

Levando em conta a literatura anterior, este autor acredita que os níveis baixos de Treg em pacientes se deve à imunossupressão (que é baseada em inibidores da calcineurina). Ele mesmo lembra que inibidores da calcineurina são potentes inibidores da ativação de células T ao bloquear produção de IL-2 que, por sua vez, é essencial para a função e sobrevivência da célula T reguladora. Nesse estudo, a imunossupressão intensa dos primeiros três meses de pós-transplante devem ter causado uma redução importante nas células T reguladoras.

Considerando estes estudos, foi postulado que o uso contínuo de inibidores de calcineurina deveria causar importante diminuição nos níveis de células T reguladoras e consequente diminuição de sua capacidade de induzir tolerância. Assim sendo, optou-se pelo uso limitado dessas drogas.

Neste trabalho, apesar do reduzido nível de células T reguladoras em todos os pacientes, aqueles que não apresentaram rejeição demonstraram uma quantidade significativamente maior de células t reguladoras e FoxP3 do que aqueles que rejeitaram. Nesta investigação, notou-se que, ao final da terapia, os níveis de FoxP3 eram baixos e que aumentaram significativamente no período subsequente. Embora não houvesse a possibilidade de comparar este número nos grupos controle, pôde-se comparar os níveis de FoxP3 ao final da terapia entre os diferentes grupos, sendo que um grupo 1 apresentou o maior nível de FoxP3.

Indivíduos submetidos a esta terapia mais tarde sofreram rejeição, o que nos faz acreditar que os mecanismos que levam à tolerância vão se expressar nas primeiras três semanas após o término da terapia e estão ligados mais à qualidade ou às características das células Treg.

Na realidade, estudos experimentais têm mostrado que a indução

de tolerância depende do bloqueio de células T efetoras e contato com o antígeno (KINGSLEY *et al*, 2002). O protocolo deste estudo preencheu estes quesitos e os resultados das células T reguladoras associados aos animais tolerantes corroboram com estes dados.

ZORN *et al.* (2006), com coleta de sangue de humanos, demonstraram que a IL-2 aumentava a quantidade de células Treg e que tinha efeito direto sobre a expressão de FoxP3. Nesse mesmo estudo foram coletadas amostras de sangue dos indivíduos de 4 a 10 meses após o término da terapia com IL-2. Nestas amostras, os níveis de células CD4+/CD25+ se apresentaram menores bem como os níveis de FoxP3.

Eles concluíram que os efeitos da IL-2 sobre as células Treg eram transitórios. Neste trabalho, a expressão de FoxP3 aumenta expressivamente após o término do protocolo de imunossupressão com a evolução para a tolerância destes indivíduos, levantando uma dúvida sobre o efeito transitório da IL-2.

Embora os níveis de IL-2 não tenham sido medidos, foi descrito na literatura que o uso de rapamicina mantém a capacidade da IL-2 em produzir apoptose e estimular a Treg.

Entretanto, foi avaliado a resposta das Treg a um protocolo experimental que deve refletir diferenças de amostras colhidas de humanos. Por outro lado, os elementos da cascata imune avaliados aqui são todos endógenos, ficando uma incerteza se as células Treg são mantidas ativadas por IL-2 ou outro mecanismo da cascata imune.

Por outro lado, ao medir os níveis dos metabólitos daIDO, observou-se que ratos, recebendo exclusivamente tacrolimus, apresentaram baixos níveis de kinurenina nos primeiros cinco dias da terapia. A kinurenina é um

metabólito resultante da ação da IDO sobre o triptofano.

JIANPING *et al.* (2007) demonstraram que a ação da IDO sobre o triptofano e seus metabólitos causam uma inibição de células CD4+ e CD8+, e, facilitando a expressão de fenótipos regulatórios, coincidentemente nos grupos deste trabalho, recebendo exclusivamente tacrolimus, houve uma redução do nível de ação da IDO e como consequência se esperaria um menor ação regulatória.

Como se pôde observar acima, espera-se que os inibidores da calcineurina, como o tacrolimus, bloqueiem a liberação de IL-2 e, portanto, o estímulo das Treg. E, embora HAUTZ *et al.* (2009) tenha observado que os níveis de FoxP3 e IDO se mantêm semelhantemente baixos ou altos de acordo com episódios de rejeição, neste estudo não se conseguiu fazer uma ligação entre a menor atividade da IDO com o uso de tacrolimus e sua ligação com FoxP3.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A associação do tacrolimus com rapamicina de forma sequencial leva a um aumento das células reguladoras e à tolerância.

O uso exclusivo de tacrolimus leva a uma menor ação da idoleamina 2,3 dioxigenase nos primeiros dias da terapia e seus efeitos reguladores.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Banz A, Pontoux C, Papiernik. Modulation of fast dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD-4 regulatory T cells and effectors T cells. *J Immunol.* 2002;169(2):750-7

Benhaim P, Anthony JP, Ferreira L, Borsanyi JP, Mathes SJ. Use of combination of low dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hind limb model of composite tissue allotransplantation. *Transplantation.* 1996;61(4):527-32

Bonatti H, Brandacher G, Margreiter R, Schneeberger S. Infectious complications in three double hand recipients: experience from a single center. *Transplantation Proceedings.* 2009;41(2):517-20

Brewer JD, Otley CC, Christenson LJ, Philips PK, Roenigk RK, Weaver AL. The effects of sirolimus on wound healing in dermatologic surgery. *Dermatol Surg.* 2008;34(2):216-23

Caballero A, Fernandez N, Lavado R, Bravo MJ, Miranda JM, Alonso A. Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transplant Immunology.* 2006;17(1):3-6

Cendales LC, Kanotakis J, Schneeberger S, Burns C, Ruiz P, Landin L, Rimmelinck M, Hewitt CW, Landgren T, Lyons B, Drachenbreg CW, Solez

K, Kirk, Kleiner DE, Racusen L. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *American Journal of Transplantation*. 2008;8(7):1396-400

Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunological Reviews*. 1996; 149:5-33

Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJW. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2006;12(2):277-84

Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human handallograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353:1315-20

Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sciences*. 1996;58(5):373-95

Ferguson TA, Green DR. T cells are just dying to accept grafts. 1999;5(11):1231-2

Ferreira L. Eficácia 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.

Ferreira LM, Anthony JP, Mathes S, Andrews JM, Laredo Filho J. Complicações em transplante alógeno microcirúrgico de membro (tecido composto) em ratos. *Rev Ass Med Brazil*. 1995;41(3):213-8

Ferreira LM, Anthony JP, Borsanyi JP, Benhaim P, Mathes SJ, Laredo Filho J, Andrews JM. Controle do processo de rejeição em transplante alógeno microcirúrgico de membro tratado com ciclosporina e RS-61443 em ratos. *Rev Ass Med Brasil*. 1995;41(1):11-9

Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News*. 1964;5:20-2

Gorantla VS, Barker JH, Jones JW, Prabhune K, Maldonado C, Granger DK. Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery*. 2000;20(8):420-9

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(7):922-32

Gorantla VS, Schneeberger S, Brandacher G, Sucher S, Zhang D, Lee WPA, Zheng XX. T regulatory cells in transplantation tolerance. *Transplant Rev*. 2010;24(3):147-159

Graça L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*. 2002;195(12):1641-6 (A)

Graça L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4+CD25+ and CD4+CD25- regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *The Journal of Immunology*. 2002;168(11):5558-65(B)

Graça L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Donor specific transplantation tolerance: The paradoxical behavior of CD4+ CD25+ T cells. *PNAS*. 2004;101(27):10122-26

Hautz T, Brandacher G, Zelger B, Muller HG, Lee AW, Fuchs D, Margreiter R, Schneeberger S. Indoleamine 2,3-dioxygenase and FoxP3 expression in skin rejection of human hand allograft. *Transplant Proc*. 2009;41(2):509-12

Horibe EK, Sacks J, Unadkat J, Raimondi G, Wang Z, Ikeguchi R, Marsteller D, Ferreira LM, Thomsom AW, Lee WP, Feili-Hariri M. Rapamycin – conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allograft in association with T regulatory cell expansion. *Transpl Immunol*. 2008;18(4):307-31

Jablecki J, Kaczmarzyk L, Patrzalek D, Chelmonski A, Domoanasiewicz A. Mild rejection episode evoked by modification of immunosuppressive protocol observed in a patient with forearm transplantation: case report, *transplant proceedings*. 2009;41(2):557-9

Jianping L, Meinhardt A, Roerich ME, Golshayan D, Dudler J, Pagnotta M, Trucco M, Vassalli G. Indoleamine 2,3-dioxygenase gene transfer

prolongs cardiac allograft survival. *AM J Heart Circ Physiol.* 2007; 293(6):H3415-23

Jones TR, Ha J, Williams MA, Adams AB, Durham MM, Rees PA, Cowan SR, Pearson TC, Larsen CP. The role of the IL-2 pathway in co stimulation blockade-resistant rejection of allograft. *The Journal of Immunology.* 2002;168(3):1123-30

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(4):688-93

Khanna AK. Mechanism of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation.* 2000;70(4):690-4

Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Méier-Kriesche HU, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation.* 1998;66(8):1040-6

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ, CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses. *The Journal of Immunology.* 2002; 168(3):1080-6

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(9):1210-4

Lanzetta M, Petruzzo P, Dubernard JM, Margreiter R, Schuind F, Breidenbach W, Nolli R, Schneeberger S, van Holder C, Gorantla VS, Pei G, Zhao J, Zhang X. Second report (1998-2006) of the international registry of hand and composite tissue transplantation. *Transplant Immunology*. 2007;18(1):1-6.

Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*. 2003;361(9376):2173-76

Madani H, Hettiaratchy S, Clarke A, Butler PEM. Immunosuppression in an emerging field of plastic reconstructive surgery: composite tissue allotransplantation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2008; 3(6):245-9

Maes BD, Vanrenterghem YFC. Cyclosporine: Advantages versus disadvantages vis-à-vis tacrolimus. *Transplantation Proceedings*. 2004; 36(2 Suppl): S40-49

Méier-Kriesche HU, Kaplan B. Toxicity and efficacy of sirolimus: relationship to whole-blood concentration. *Clinical Therapeutics*. 2000; 22(Suppl B):B93-100

Müller-Steinherdt M, Wortmeier K, Fricke L, Ebel B, Härtel C. The pharmacodynamic effect of Sirolimus: individual variation of cytokine mRNA expression profiles in human whole blood samples. *Immunobiology*. 2009;214(1):17-26.

Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Therapeutic drug monitoring*. 2001;23(5): 559-86

Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. 2004; 172(7):3983-8

Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigenpresenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006;7(6):652-62

Petit F, Minns AB, Dubernard JM, Hettiaratchy S, Lee WP. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery: first clinical applications. *Annals of Surgery*. 2003;237(1):19-25

Petruzzo P, Badet L, Gazarian A, Lanzetta M, Parmentier H, Kanitakis J, Sirigu A, Martin X, Dubernard JM. Bilateral hand transplantation: Six years after the first case. *American Journal of Transplantation*. 2006; 6(7):1718-24

Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, Mrgreiter R, Schuind F, Breidenbach W, Nolli R, Schneeberger S, van Holder C, Kaufman C, Jablecki J, Landin L, Cavadas P. The international registry on hand and composite tissue transplantation. *Transplantation*. 2008;86(4):487-92

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shapiro AM, Rajotte RV, Power R. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents

expontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002;51(3):638-45

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -Chains (CD25). *The Journal of Immunology*. 1995;155(3):1151-64

Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol*. 1994; 10(24):2383-92.

Sehgal SN. Sirolimus: Its Discovery, biological properties and mechanism of action. *Transplantation Proceedings*. 2003;35(suppl 3 A):S7-14

Semionov M, Klimczak A. Basics of immune responses in transplantation in preparations for application of composite tissue allograft in Plastic and reconstructive. *Surgery: Part 1. Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008;121(1):e4-12

Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001;166(2):973-81

Taieb A, Clavijo-Alvarez J, Hamad GG, Lee WPA. Immunologic approaches to composite tissue allotransplantation. *The Journal of Hand Surgery*. 2007;32A(7):1072-85

Thervet E, Sirolimus therapy following early cyclosporine withdrawal in transplant patients: mechanisms of action and clinical results. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(3):269-81

Waldmann H, Chen TC, Graça L, Adams E, Daley S, Cobbold S, Fairchild PJ. Regulatory T cells in transplantation. *Seminars in Immunology*. 2006;18(2):111-9

Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):199-210

Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi Lv. Role and mechanisms of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transplant Immunology*. 2007;17(2):120-9

Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity*. 2003;19(4):503-14

Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, Frank DA, Ritz J. IL-2 regulates FoxP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 2006;108(5):1571-9

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. [www.bireme.br/terminologia em saúde](http://www.bireme.br/terminologia-em-saude).

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>](http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Nomina Anatomica Veterinaria.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Regulatory mechanisms play an important role on maintenance of tolerance in transplant. The intend of this study is develop a strategy for tolerance based in the sequential association of Tacrolimus and Rapamycin. **Aim:** Study the effects of Tacrolimus and Rapamycin on T regulatory cells in Composite allotransplantation. **Methods:** The model was hind limb transplant from Brown-Norway to Lewis rats. 2 experiments were made. One to evaluate regulatory activity of transplants and another to identify its mechanism of action. On experiment 1 rats were divided in 4 groups, the experimental (Tacrolimus from POD 0 to 7 and Rapamycin from POD 8 to 21). The other 3: Rapamycin 21d, Tacrolimus 21d and both 21d. Blood samples were collected for flow cytometry on POD 21 and 45. In a second experiment animals divided in 4 groups with similar therapeutics than experiment 1, submitted to the same procedure, with collect of blood samples to measure the levels of Indoleamine 2,3-dioxygenase on POD 0,5,10,15,21.. **Results:** On experimental group there was not rejection no POD 150 of 66% of the animals, in two groups 100% rejected and in the last 75% rejected. In the experimental group was a significant increase of T regulatory cells on POD 45 comparing to POD21. ON second experiment was observed a low activity of IDO on POD 5 in animals receiving exclusively Tacrolimus. **Conclusion:** The association of Tacrolimus and Rapamycin sequentially leads to an increase of T regulatory and to tolerance and reduced activity of IDO on POD 5 of animals receiving exclusively Tacrolimus as well.

APÊNDICE

APÊNDICE

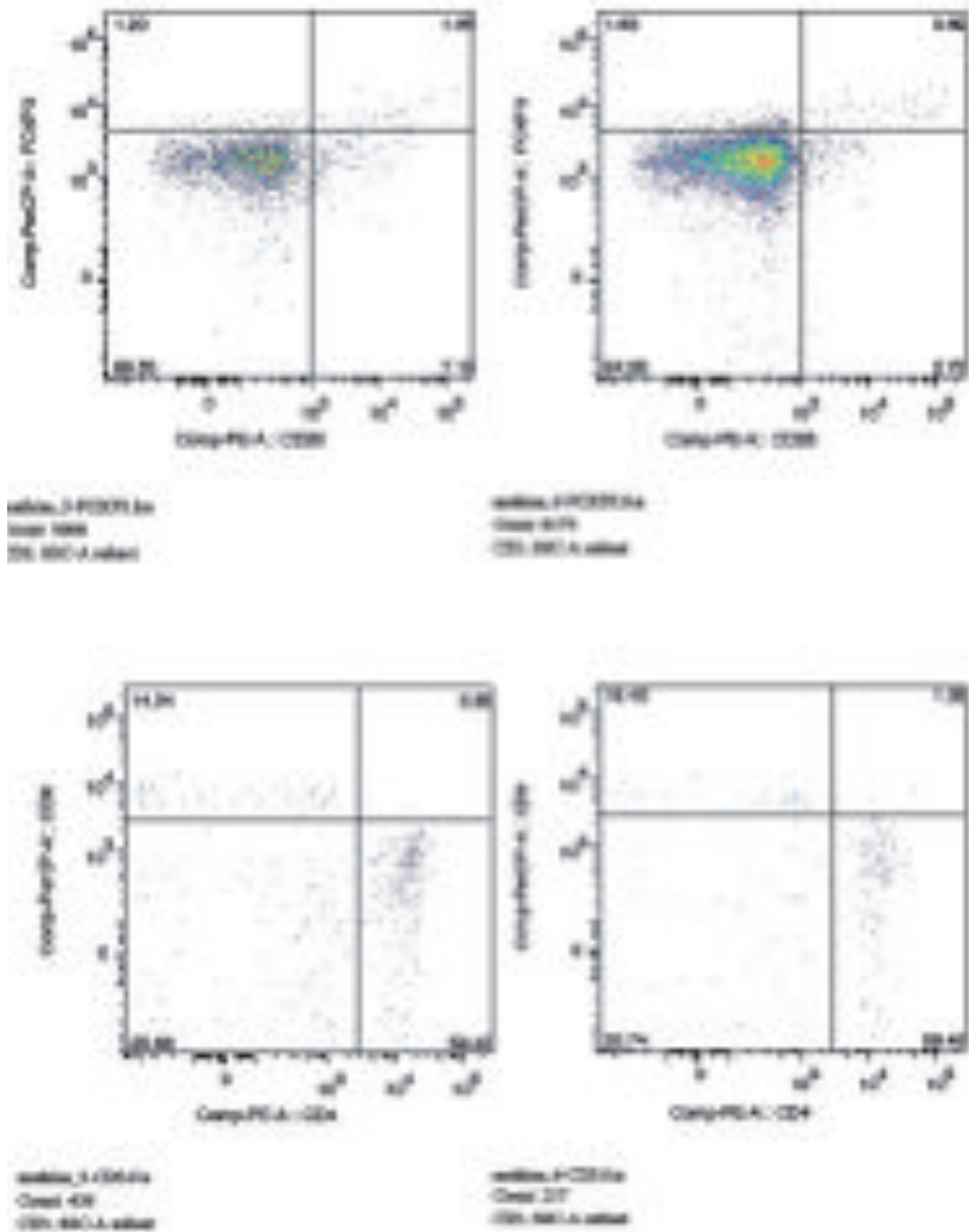


FIGURA Resultado citometria de fluxo PO 21 ratos 1 (amostra 3) e 2 (amostra 4)

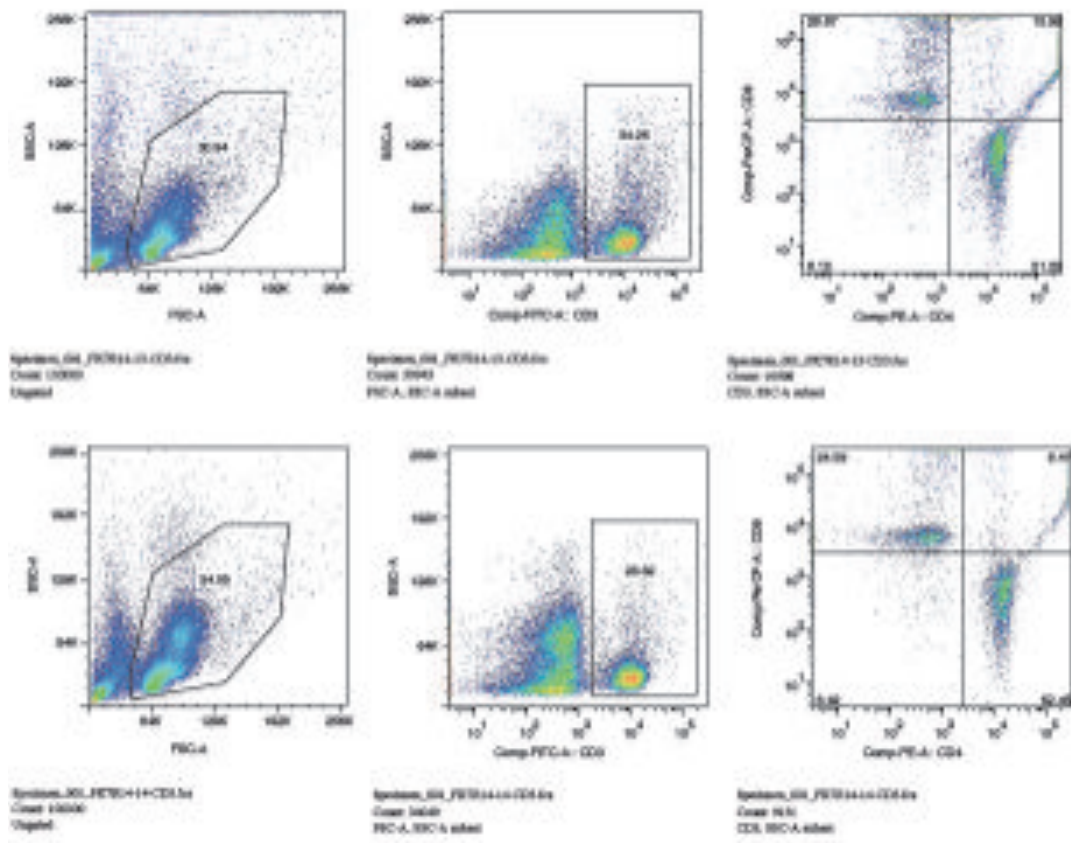


FIGURA Resultado da citometria de fluxo ratos 1 (amostra 13) e 2 (amostra 14) PO 45 para CD3, CD4 e CD8

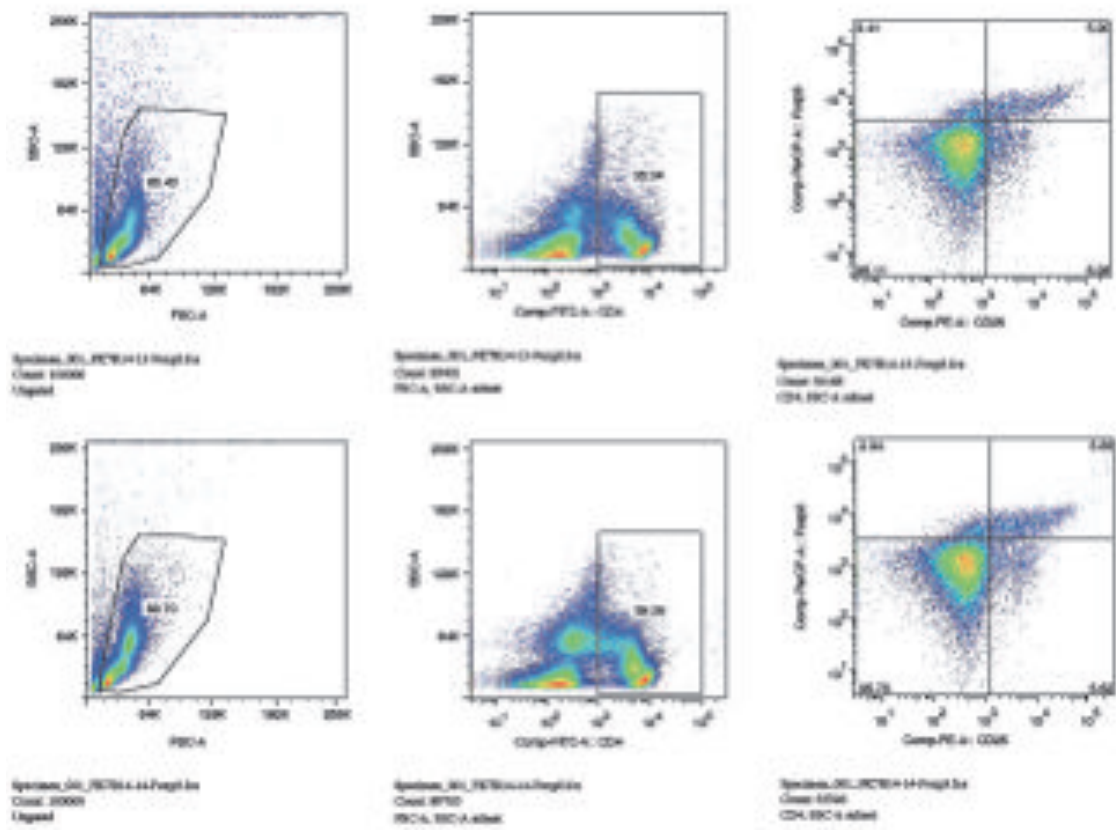


FIGURA Resultado de citometria de fluxo para ratos 1 e 2 grupo experimental PO 45

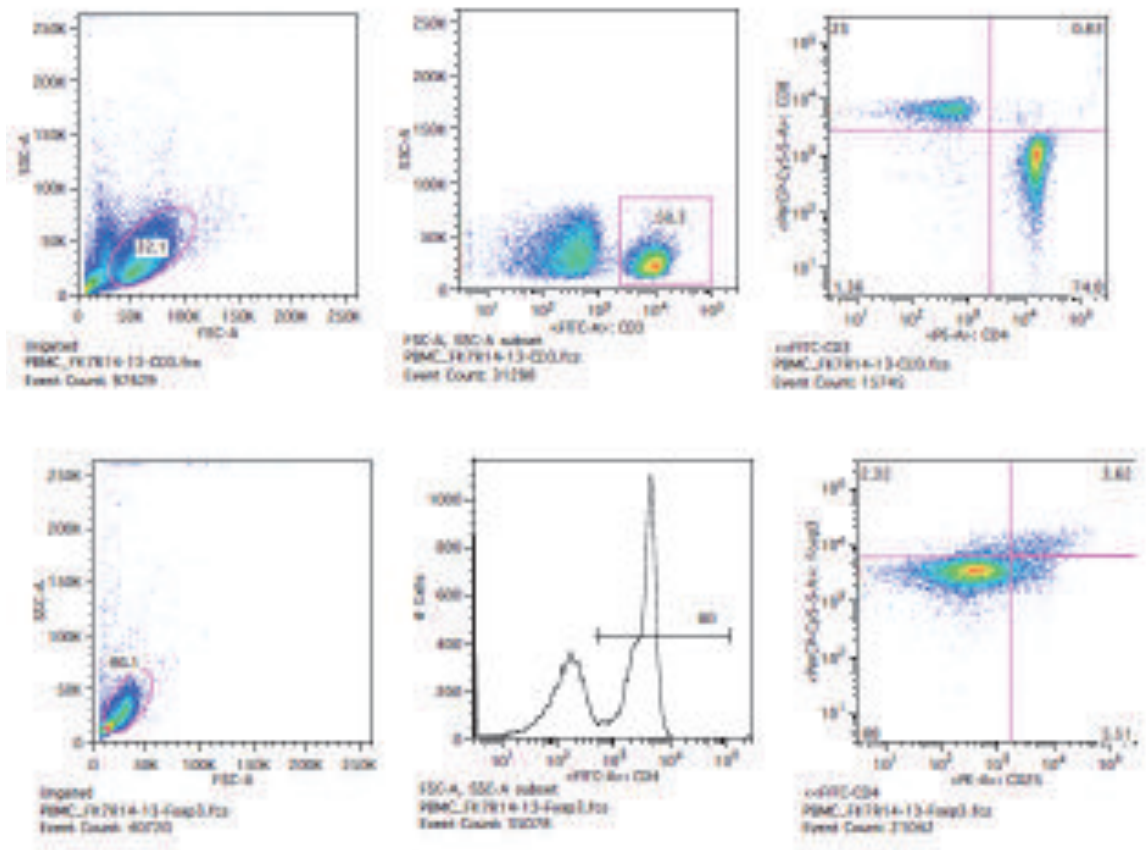


FIGURA Resultado citometria de fluxo rato 1 grupo experimental PO 170

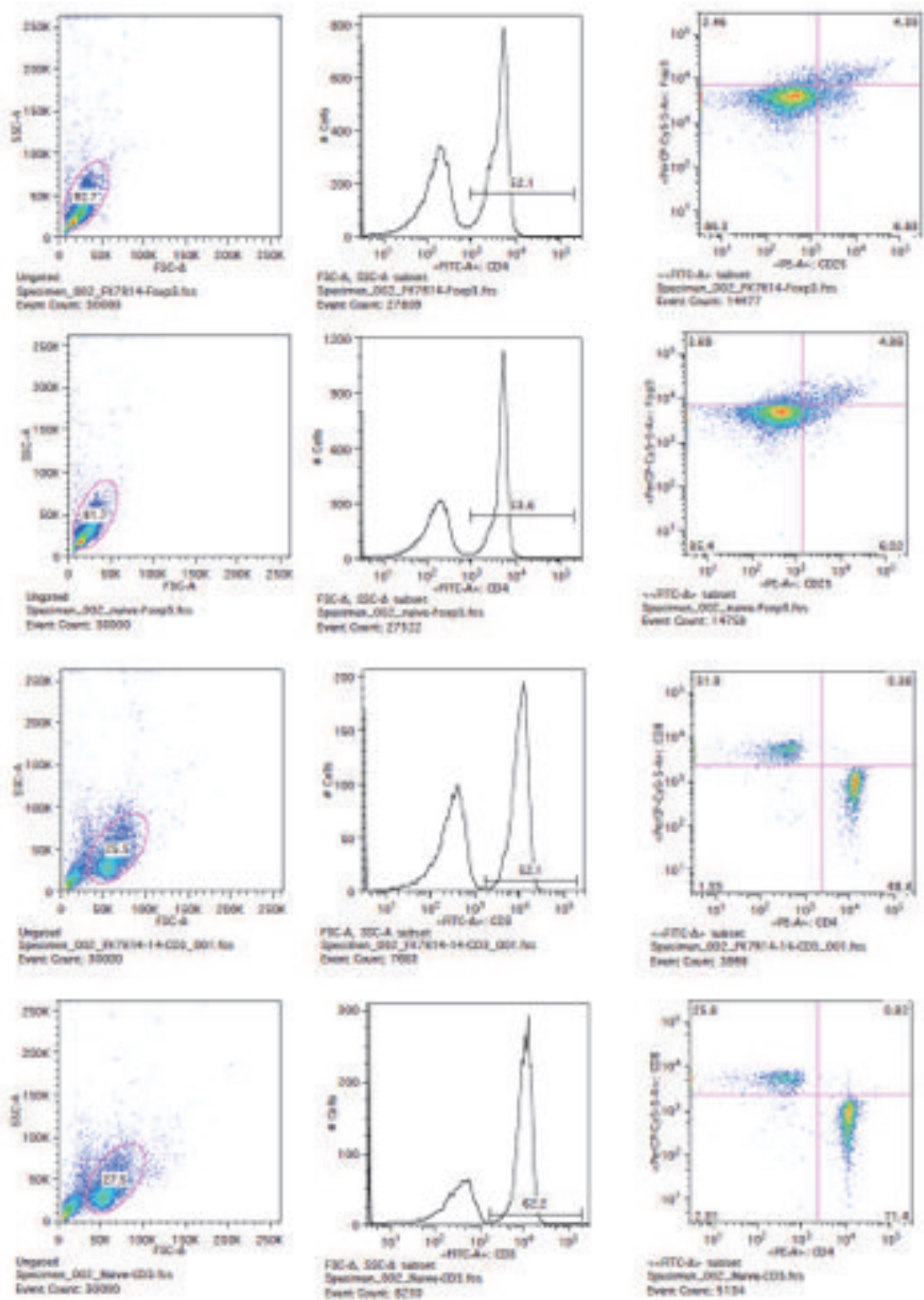


FIGURA Resultado de citometria de fluxo rato 2 grupo experimental PO 170

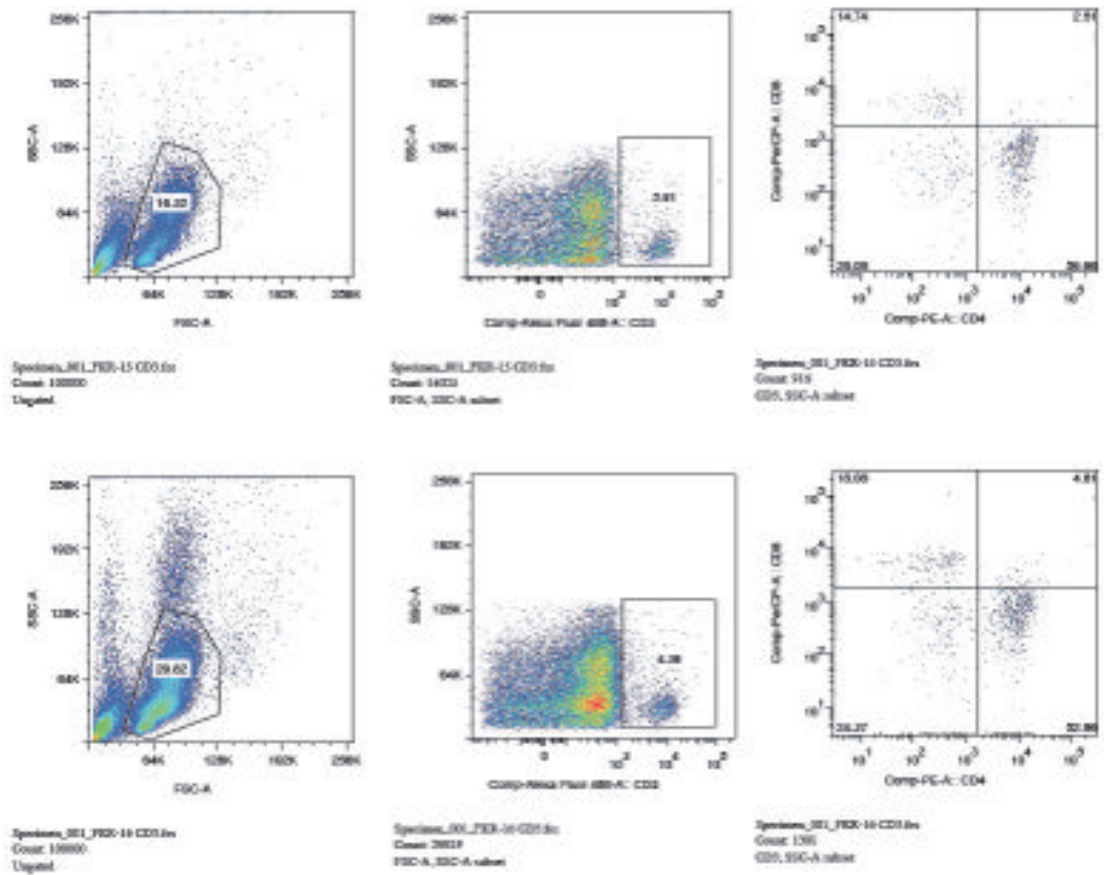


FIGURA Resultado citometria de fluxo ratos 3 (amostra 15) e 4 (amostra 16) grupo experimental PO 21 CD3, CD4 e CD8

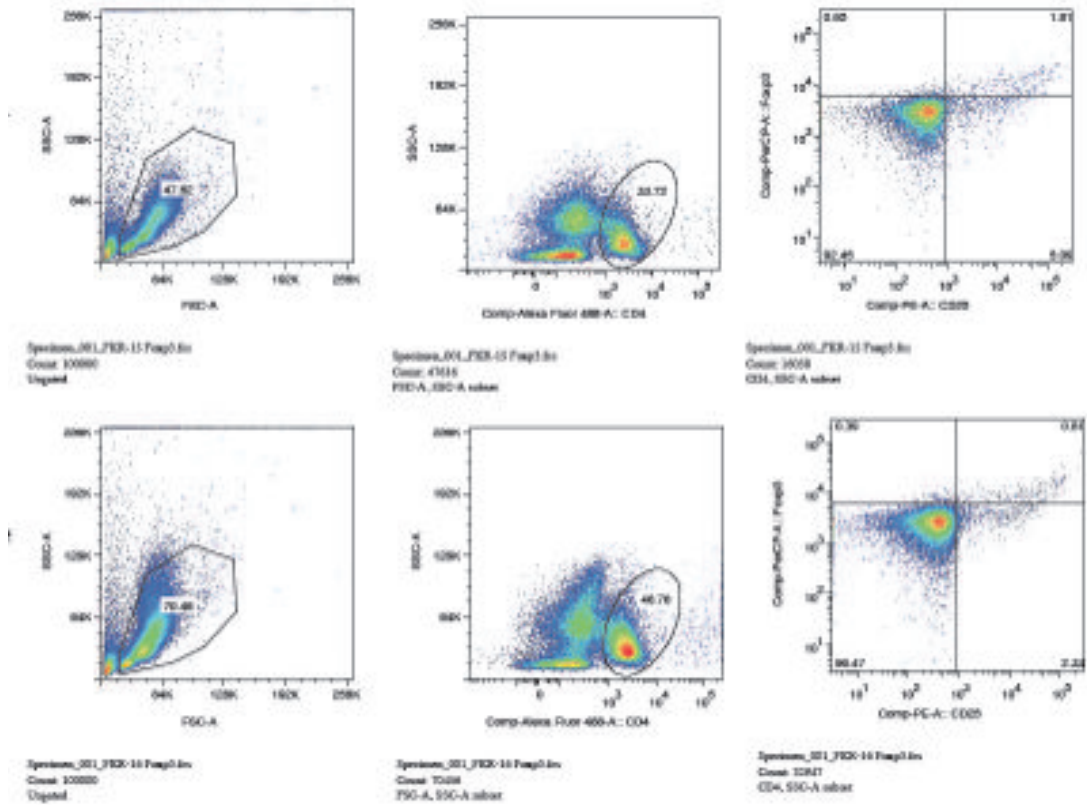


FIGURA Resultado citometria de fluxo ratos 3 e 4 grupo experimental PO 21 para CD25 e FoxP3

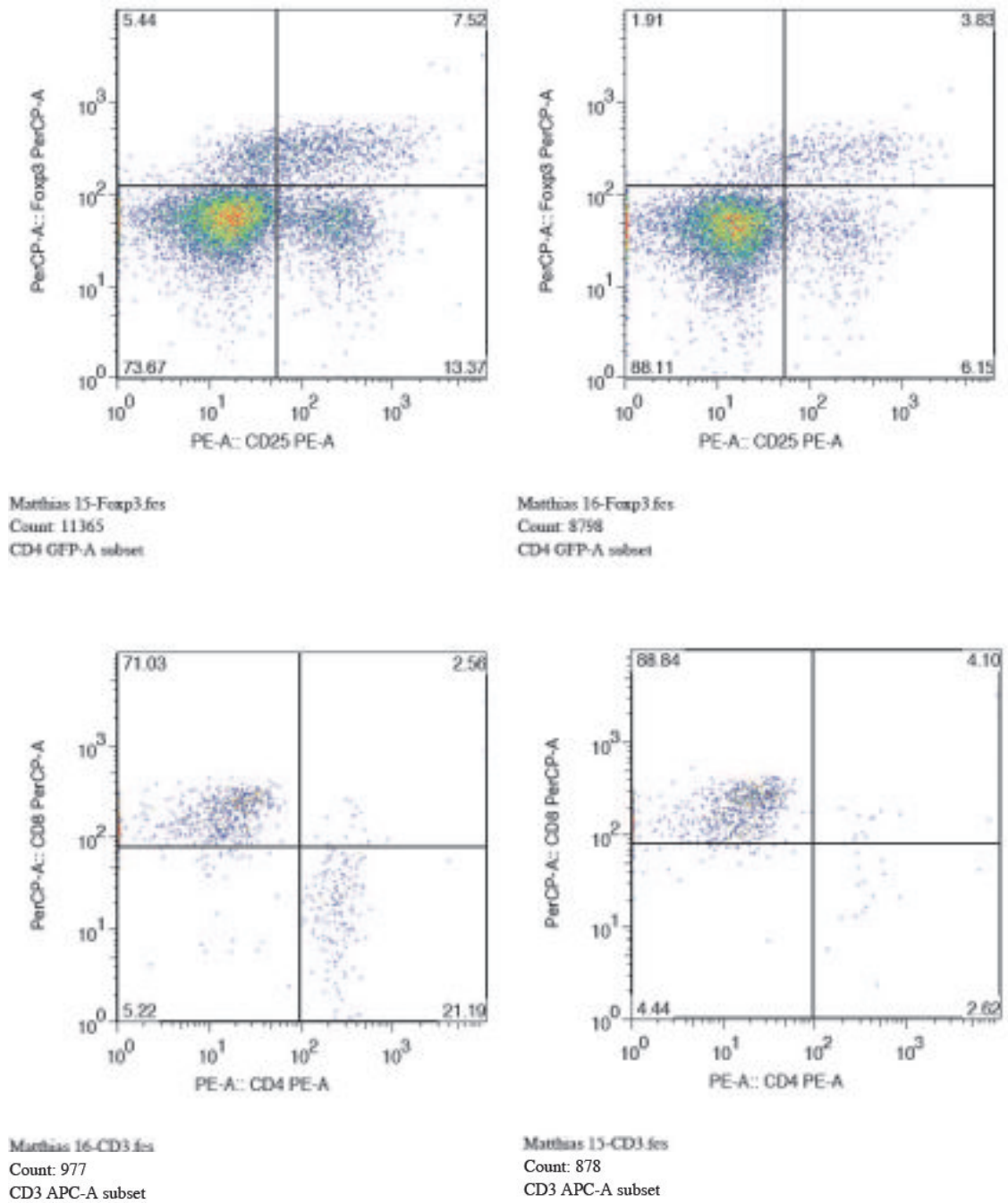
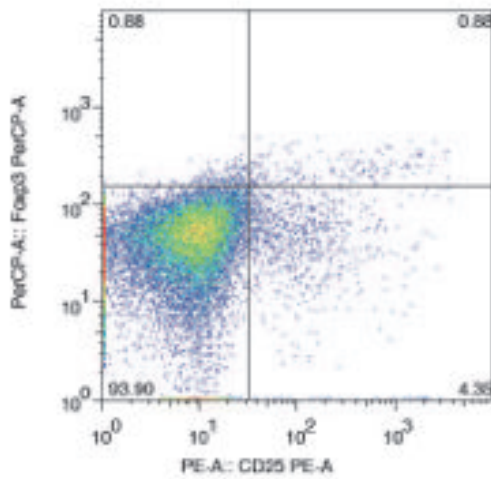
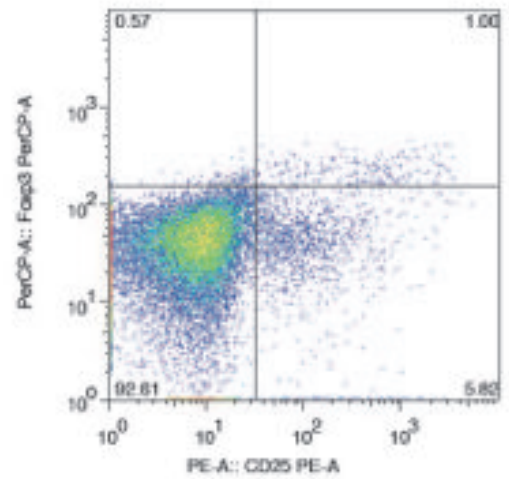


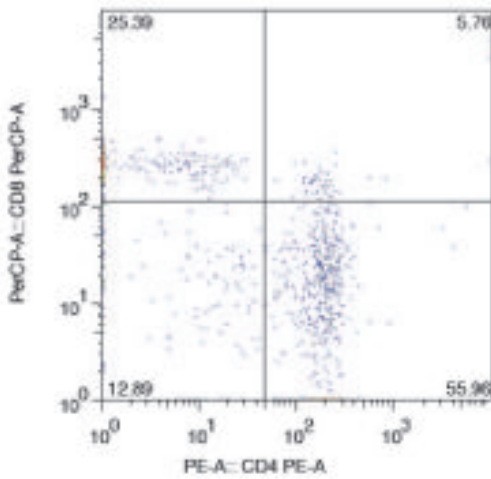
FIGURA Resultado da citometria de fluxo PO 45 ratos 3 e 4 grupo experimental



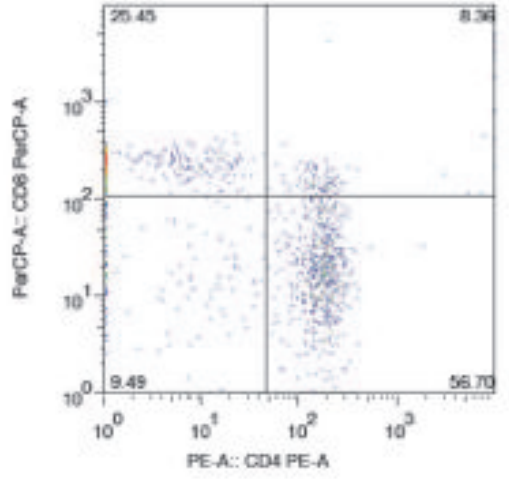
Specimen_001_17-Foxp3.fcs
Count: 21366
CD4 FITC-A, SSC-A subset



Specimen_001_18-Foxp3.fcs
Count: 23119
CD4 FITC-A, SSC-A subset



Specimen_001_17-CD3.fcs
Count: 1034
CD3 FITC-A, SSC-A subset



Specimen_001_18-CD3.fcs
Count: 1328
CD3 FITC-A, SSC-A subset

FIGURA Resultado citometria de fluxo ratos 5 (amostra 17) e 6 (amostra 18) grupo experimental PO 21

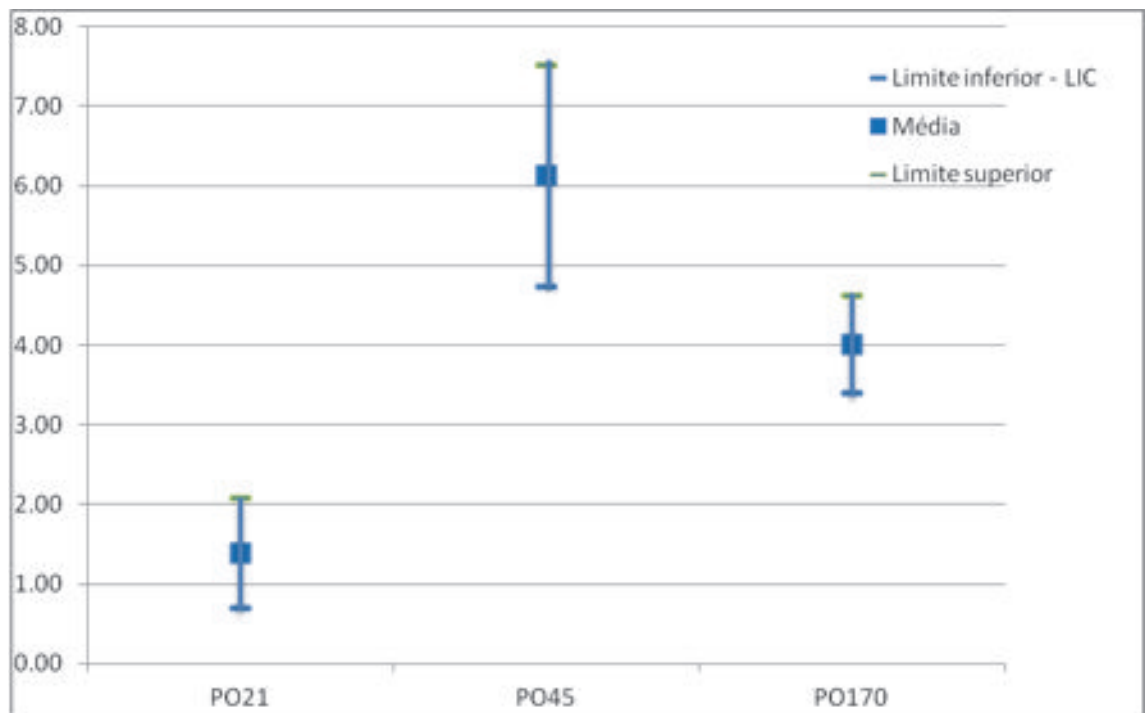


FIGURA Gráfico níveis de FoxP3, em PO 21, PO45 e PO170 grupo experimental

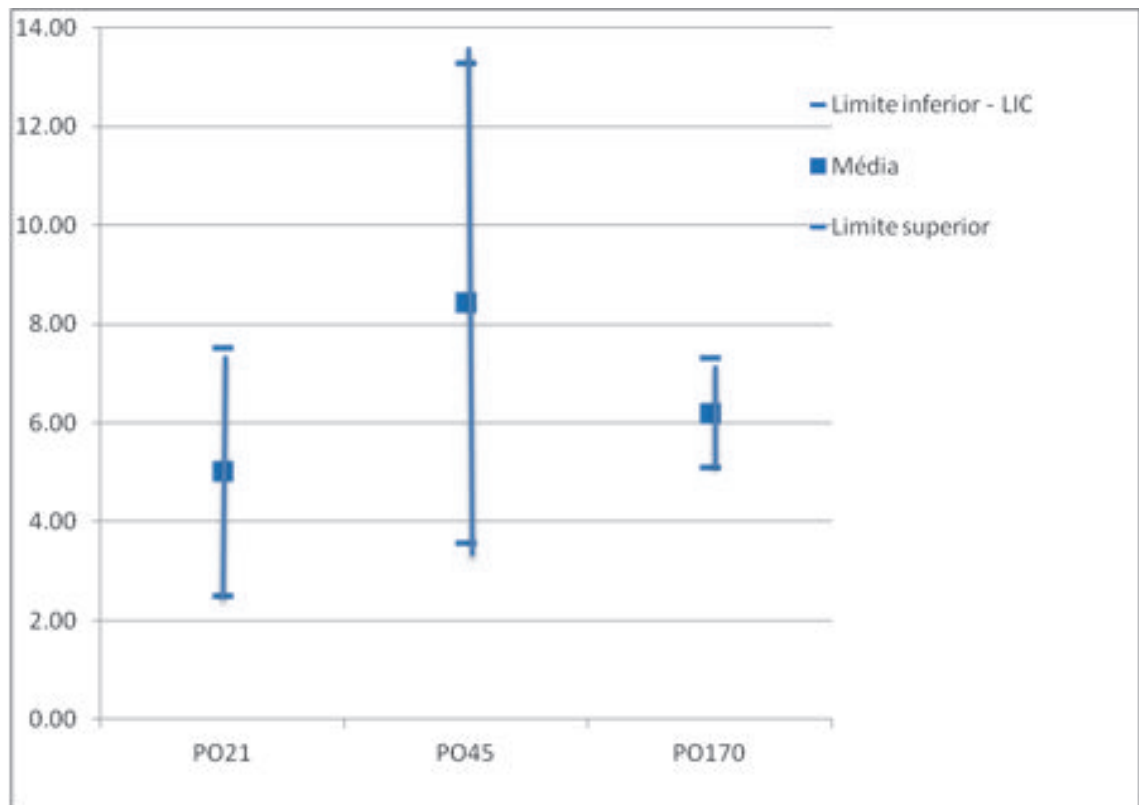


FIGURA Gráfico dos níveis de CD25 em PO21, PO45 e PO170 grupo experimental

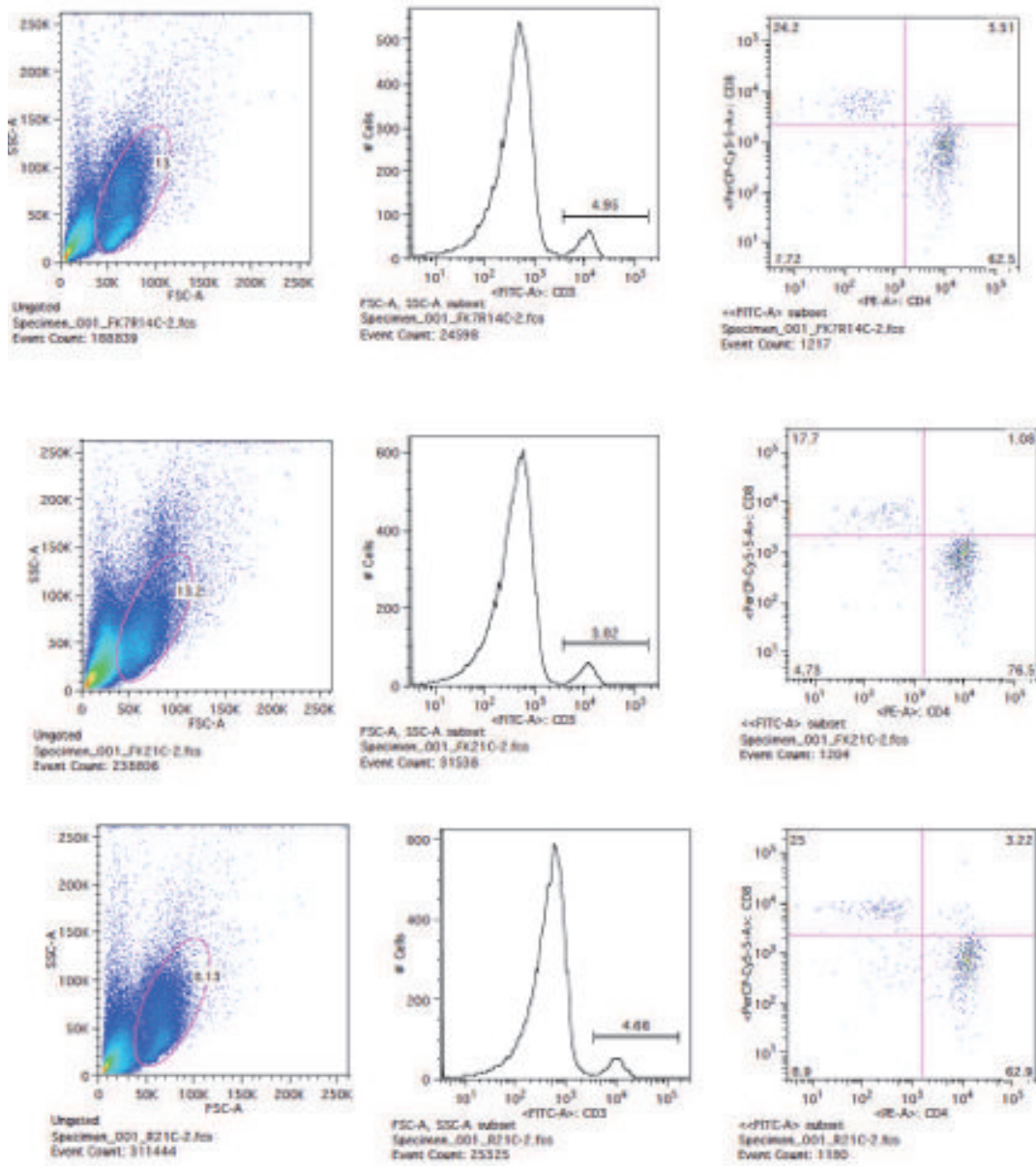


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2 CD3, CD4 e CD8 animais número 1 :

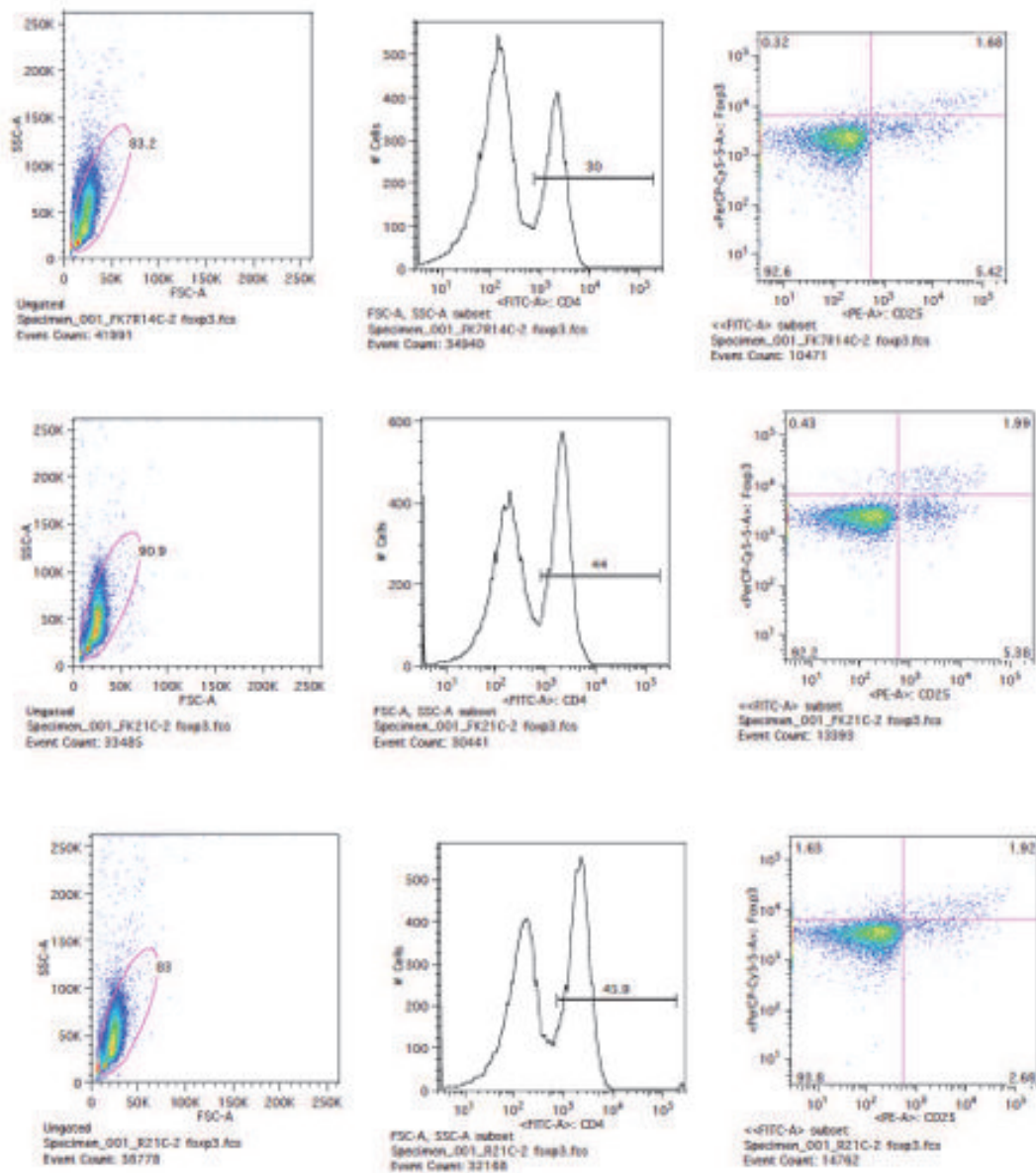


FIGURA Resultado citometria de fluxo CD25 e FoxP3 experimento 2 animais número 1

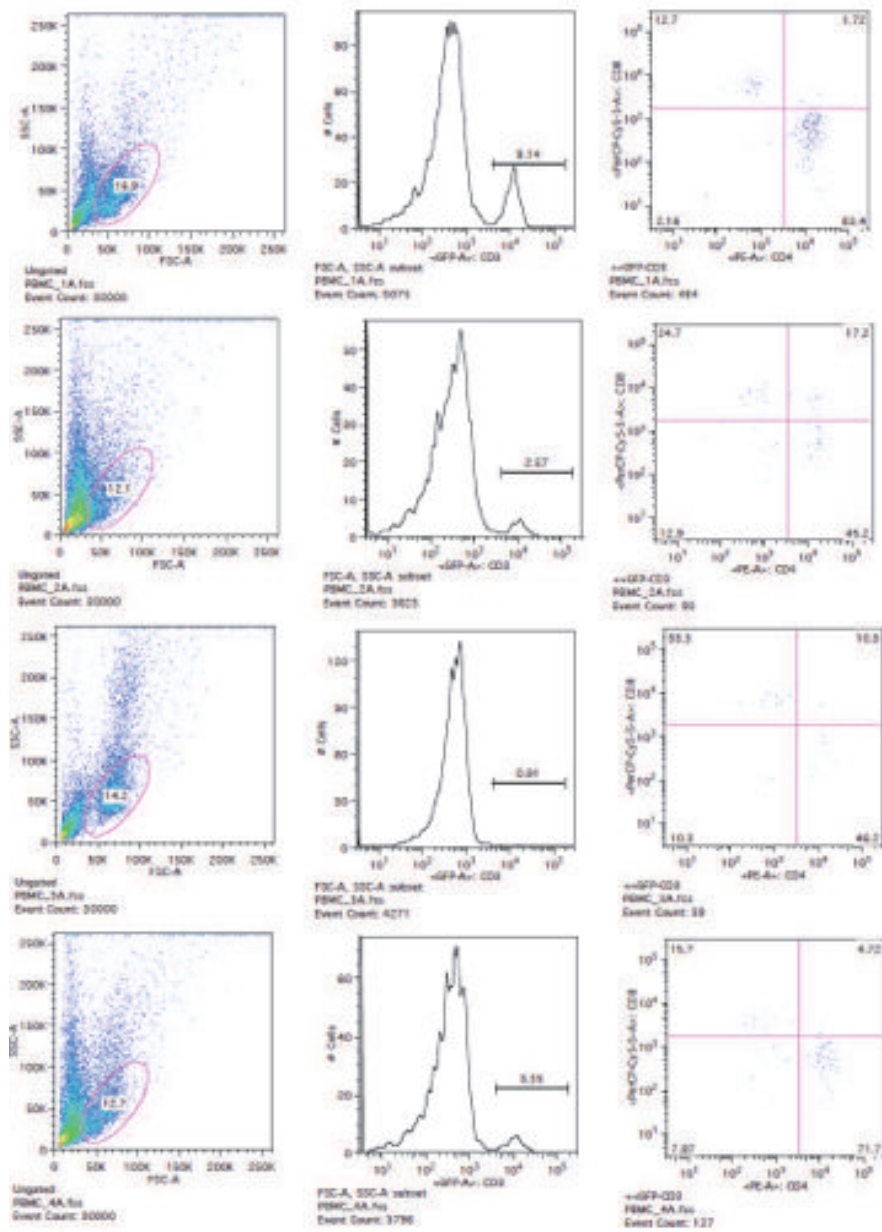


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2

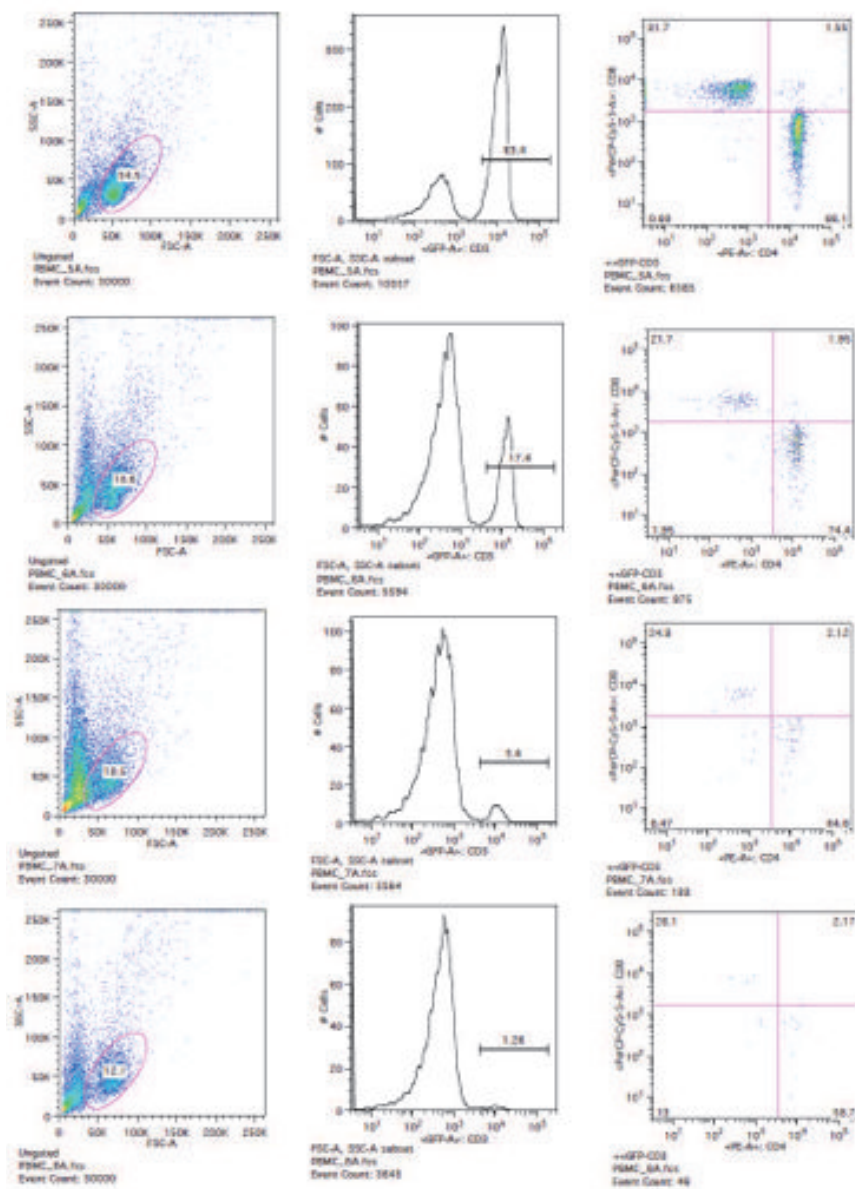


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2

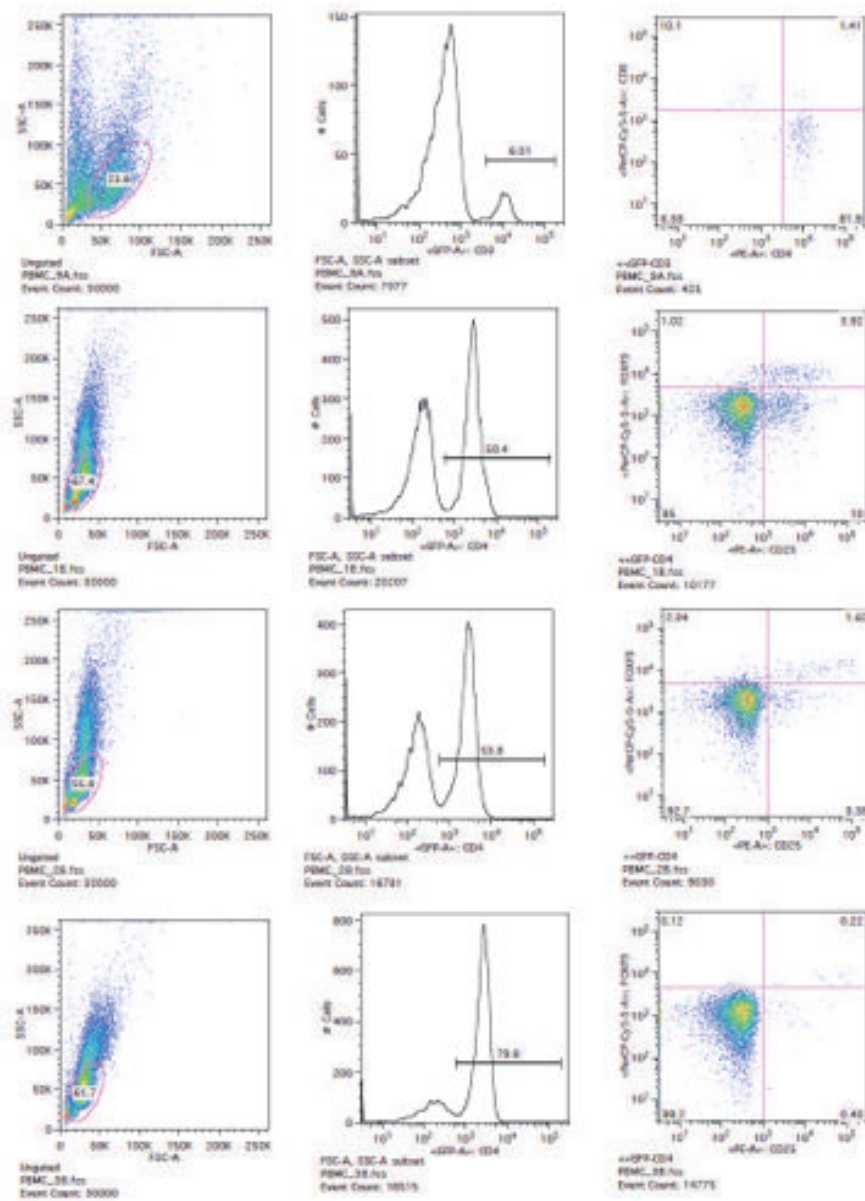


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2

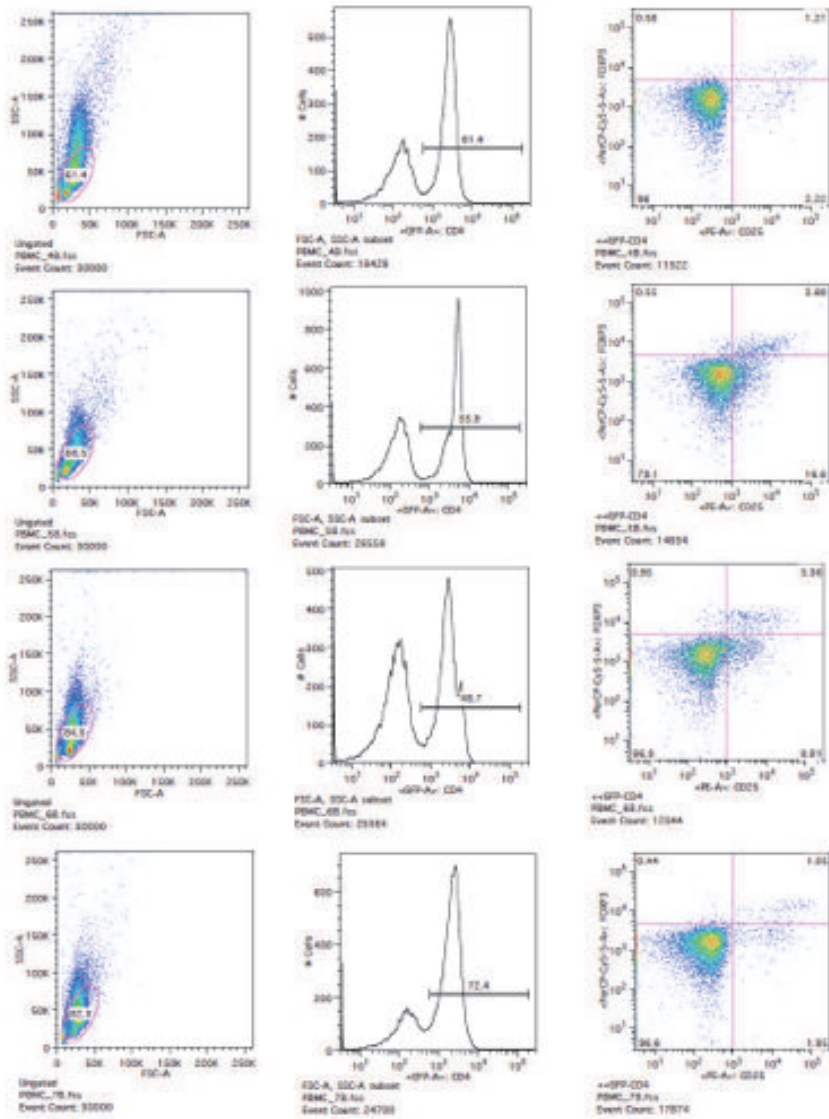


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2

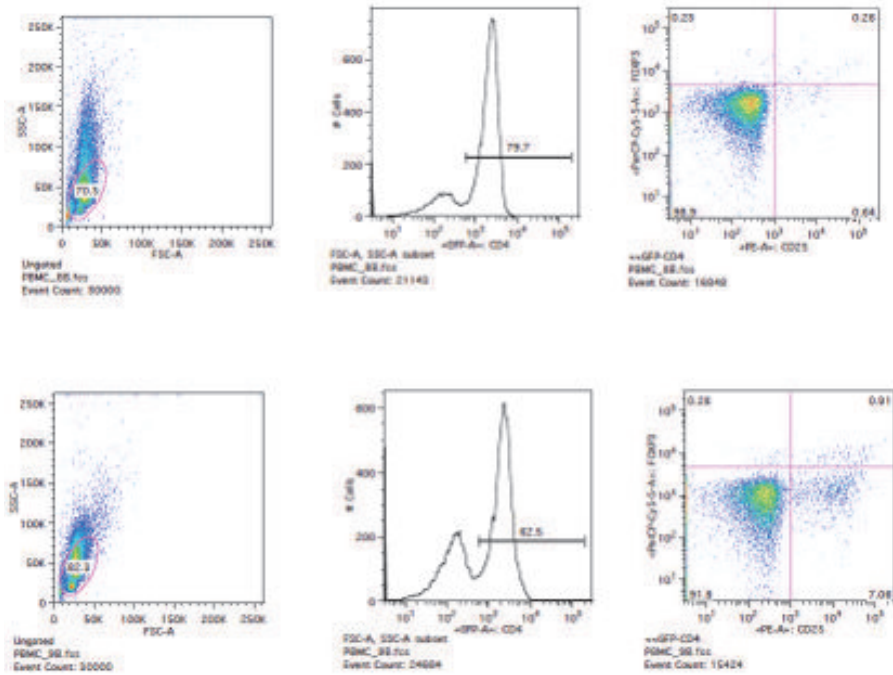


FIGURA Resultado citometria de fluxo experimento 2:

Dados curva de sobrevivida dos transplantes:

Grupo Grupo	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
0 Grupo experimental	6	2	4	66,7%
1 Grupo controle 1	4	3	1	25,0%
2 Grupo controle 2	4	4	0	,0%
3 Grupo controle 3	4	3	1	25,0%
Overall	18	12	6	33,3%

TABELA

Grupo	Time	Status	Cumulative Proportion Surviving at the Time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases	
			Estimate	Std. Error			
0 Grupo experimental	1	35,000	1	.	.	1	5
	2	35,000	1	,667	,192	2	4
	3	150,000	0	.	.	2	3
	4	150,000	0	.	.	2	2
	5	150,000	0	.	.	2	1
	6	150,000	0	.	.	2	0
1 Grupo controle 1	1	42,000	1	,750	,217	1	3
	2	49,000	1	,500	,250	2	2
	3	64,000	1	,250	,217	3	1
	4	150,000	0	.	.	3	0
2 Grupo controle 2	1	43,000	1	,750	,217	1	3
	2	63,000	1	,500	,250	2	2
	3	92,000	1	,250	,217	3	1
	4	107,000	1	,000	,000	4	0
3 Grupo controle 3	1	38,000	1	,750	,217	1	3
	2	92,000	1	,500	,250	2	2
	3	104,000	1	,250	,217	3	1
	4	150,000	0	.	.	3	0

TABELA Means and Medians for Survival Time

Grupo Grupo	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
0 Grupo experimental	111,667	22,132	68,288	155,045
1 Grupo controle 1	76,250	21,657	33,801	118,699	49,000	11,000	27,440	70,560
2 Grupo controle 2	76,250	14,361	48,103	104,397	63,000	24,500	14,980	111,020
3 Grupo controle 3	96,000	19,937	56,923	135,077	92,000	33,000	27,320	156,680
Overall	92,444	10,878	71,124	113,765	92,000	29,515	34,151	149,849

TABELA Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,499	3	,475

Dados medição IDO:

TABELA

Dia		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total	
0	TRP em micro mol/l	N	3	3	3	3	12
		Mean	40,28 ^a	40,66 ^a	38,47 ^a	37,78 ^a	39,30
		Std. Deviation	8,13	2,46	6,20	3,69	4,92
	KYN em micro mol/l	N	3	3	3	3	12
		Mean	1,91	5,77	3,09	8,79	4,89
		Std. Deviation	1,37	3,96	1,43	11,83	6,06
	KYN/TRP em micro mol / m mol	N	3	3	3	3	12
		Mean	52,62	145,07	83,41	214,78	123,97
		Std. Deviation	41,41	101,41	41,64	276,80	143,65
	Nitrit/at em micro M	N	3	3	3	3	12
		Mean	74,33	93,85	70,42	85,18	80,94
		Std. Deviation	26,57	12,02	30,05	33,72	24,86
5	TRP em micro mol/l	N	3	3	3	3	12
		Mean	50,85	51,27	54,49	56,55	53,29
		Std. Deviation	9,80	13,38	11,74	6,41	9,41
	KYN em micro mol/l	N	3	3	3	3	12
		Mean	0,78 ^a	1,46 ^b	1,8 ^b	0,91 ^a	1,24
		Std. Deviation	0,40	0,23	0,18	0,41	0,51
	KYN/TRP em micro mol / m mol	N	3	3	3	3	12
		Mean	15,39	28,92	33,53	16,76	23,65
		Std. Deviation	7,48	3,29	3,97	8,75	9,73
	Nitrit/at em micro M	N	3	3	3	3	12
		Mean	58,56	40,68	36,43	25,93	40,40
		Std. Deviation	16,93	21,37	19,15	2,07	18,81
10	TRP em micro mol/l	N	3	3	3	3	12
		Mean	60,63	51,88	26,54	48,13	46,79
		Std. Deviation	7,19	10,64	3,74	27,68	18,53
		N	3	3	3	3	12

	KYN em micro mol/l	Mean	1,21	0,93	0,98	0,59	0,93
		Std. Deviation	0,15	0,22	0,41	0,13	0,32
		N	3	3	3	3	12
	KYN/TRP em micro mol / m mol	Mean	20,38	17,83	38,76	14,98	22,99
		Std. Deviation	4,62	0,54	19,31	8,37	13,38
		N	3	3	3	3	12
	Nitrit/at em micro M	Mean	21,42	43,11	42,59	29,83	34,24
		Std. Deviation	6,25	30,08	17,71	11,46	18,52
		N	3	3	3	3	12
	TRP em micro mol/l	Mean	55,56	42,19	32,54	41,87	43,04
		Std. Deviation	10,20	18,40	9,06	14,73	14,43
		N	3	3	3	3	12
15	KYN em micro mol/l	Mean	0,76	0,87	0,81	0,59	0,76
		Std. Deviation	0,10	0,20	0,39	0,03	0,22
		N	3	3	3	3	12
	KYN/TRP em micro mol / m mol	Mean	14,14	22,41	25,36	15,52	19,36
		Std. Deviation	4,28	6,85	10,29	6,60	7,93
		N	3	3	3	3	12
	Nitrit/at em micro M	Mean	32,78	67,73	27,84	38,86	41,80
		Std. Deviation	16,61	33,09	3,02	3,35	22,67
		N	3	3	3	3	12
	TRP em micro mol/l	Mean	55,17	51,32	59,35	58,47	56,08
		Std. Deviation	17,23	18,99	20,30	7,66	14,70
		N	3	3	3	3	12
21	KYN em micro mol/l	Mean	1,53	1,64	0,93	0,56	1,17
		Std. Deviation	1,15	1,16	0,46	0,08	0,86
		N	3	3	3	3	12
	KYN/TRP em micro mol / m mol	Mean	30,91	39,04	16,58	9,72	24,06
		Std. Deviation	29,46	38,59	8,82	1,51	24,26
		N	3	3	3	3	12
	Nitrit/at em micro M	Mean	61,83	92,29	37,99	28,97	55,27
		Std. Deviation	37,75	14,54	15,91	14,55	32,21
		N	3	3	3	3	12

a,b,c correspondem a grupos com médias similares



University of Pittsburgh

*Research Conduct and Compliance Office
Institutional Animal Care and Use Committee*

Heber Building, Suite 206
5000 Fifth Avenue
Pittsburgh, PA 15213
412-383-3000
Fax: 412-383-2000

University of Pittsburgh Protocol Number: 1001456A-2

January 28, 2011

Department of Surgery, Division of Plastic Surgery

Assurance Number: A3187-01

To Whom It May Concern:

The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pittsburgh has reviewed and approved on January 28, 2011 the research proposal submitted by Xinxiao Zheng.

Titled: Drug sequence and duration for the promotion of regulatory mechanisms in limb allografts

The committee finds that the protocol meets the standards for humane animal care and use as set by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'Frank J. Jenkins'.

Frank J. Jenkins, Ph.D., Chair
Institutional Animal Care and Use Committee

This letter is valid until January 31, 2012.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de junho de 2008.
CEP 0631/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MATTHIAS WOLFGANG MATHONY WEINSTOCK
Co-Investigadores: Andrew P. Lee, Elaine K. Horibe, An Wan Ching, José Arimatéia Mendes, Lyda Masako Ferreira (orientadora)
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: **"Indução de tolerância de transplante composto alógeno através do uso de FK506 tóxico e radiação UVB associado a transplante de medula óssea de precursores de células de Langerhans"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Estabelecer privilégio imunológico na pele do transplante alógeno de tecido composto (TATC). Manter privilégio imunológico na pele de TATC e estabelecer tolerância. Aproveitar o especial privilégio dos folículos pilosos para atingir a alta antigenicidade da pele em TATC e estabelecer tolerância sem a necessidade de imunossupressão prolongada.

RESUMO: Estudo com 81 ratos Fisher e ACI. Anestésico: pentobarbital sódico. Analgésico: morfina. Eutanásia: KCl. Os experimentos serão realizados no laboratório de Transplantes da Disciplina de Cirurgia Plástica e Reperadora da Universidade de Pittsburgh. O estudo será realizado em um modelo experimental de ratos com discordância total do complexo de histocompatibilidade, ACI e WF. Ambos serão irradiados com UVB no dia da cirurgia. Receptores WF serão tratados adicionalmente com soro anti-infecção e receberão retalhos cutâneos ou pata traseira de doadores ACI. Após transplante, receptores WF receberão células depletadas de medula óssea e serão tratadas com FK506. Será realizada citometria de fluxo para pesquisa da presença de quimerismo de células de Langerhans e confirmação imuno-histoquímica de interações entre queratinócitos do doador e células de Langerhans do doador. A pata traseira será avaliada clinicamente e em estudos de tolerância in vivo e in vitro.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O componente cutâneo do Transplante Alógeno de Tecido Composto, como retalhos cutâneos ou transplantes de membros, é altamente imunogênico devido a potentes células apresentadoras de antígenos, células de Langerhans.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, sendo a pesquisa conduzida na Universidade de Pittsburgh, anexadas as cartas de ciência do Dr Andrew Lee e de aprovação do CEP.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 15/6/2009 e 15/6/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 27 de junho de 2011.
CEP 0631/08
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MATTHIAS WOLFGANG MATHONY WEINSTOCK
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Indução de tolerância de transplante composto alógeno através do uso de FK506 tópico e radiação UVB associado a transplante de medula óssea de precursores de células de Langerhans".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU Emenda ao projeto (versão 1 de 31/mai/2011) do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 0631/08

São Paulo. 31/05/2011

Ao Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Adendo Ref. CEP 0631/08

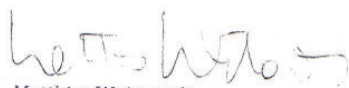
Prezado Senhor,

Venho por meio desta comunicar alteração em projeto CEP 0631/08.
Foi decidido a suspensão do uso da radiação UVB pois, apesar de efeito indutor aplicável em modelo animal, tem transcrição difícil ao ser humano, desse modo decidimos manter apenas o uso de soro anti-linfócito. A utilização deste soro tem efeito indutor na terapia imunossupressora comprovado, sendo inclusive liberado para uso em humanos, é indolor e elimina os efeitos colaterais do uso da radiação. Foi, também, eliminado o uso de células de medula óssea depletadas e introduzido o uso de Rapamicina que é um imunossupressor de uso autorizado em humanos e sem efeitos colaterais aos animais.

Por formar uma barreira de histocompatibilidade com maior resposta imune e, portanto, mais adequada para a realização de pesquisa em transplante, foi optado por realizar transplantes de pata traseira de ratos Brown-Norway para receptores Lewis.

A metodologia quanto ao procedimento cirúrgico e cuidados aos animais permanece inalterada garantindo a ausência de dor ou stress das cobaias, mantendo o respeito às normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.

Desde já fico à disposição para o esclarecimento de eventuais dúvidas.
Cordiais saudações,


Matthias Weinstock

