DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA-
INSTITUTO DE BIOLOGIA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS-UNICAMP

INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE SANGUE PELAS VIAS INTRAVENOSA OU ORAL ANTECEDENDO O ALOTRANSPLANTE DE TECIDO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS

SONIA CANO MONTEBELO RACHEL

R114i

36606/BC

Campinas, 1998

SONIA CANO MONTEBELO RACHEL

INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE SANGUE PELAS VIAS INTRAVENOSA OU ORAL ANTECEDENDO O ALOTRANSPLANTE DE TECIDO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Sonia Cano Montebelo Rachel e aprovada pela Comissão Julgadora.
18/12/98

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

CAMPINAS
1998

1999045871
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
V. Ex.
TOMBO BC/ 36606
PROC. 229/99
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 20/02/99
N.º CPD

CM-00121009-0

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Rachel, Sonia Cano Montebelo

R114i Influência da administração de sangue pelas vias intravenosa ou oral antecedendo o alotransplante de tecido cardíaco em camundongos/Sonia Cano Montebelo Rachel. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.

75f.:ilus.

Orientador: Paulo Maria Ferreira de Araújo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Transplante. 2. Camundongo. 3. Sangue-transfusão. I. Araújo, Paulo Maria Ferreira de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

Campinas, 18 de dezembro de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo (orientador) _____

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada _____

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos _____

SUPLENTES:

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo _____

Aos meus pais,

João e Ruth;

OFEREÇO

Ao meu esposo *Higino*

E aos meus filhos *Diogo e Cíntia*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao acaso da ciência.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, que, com ênfase aos valores éticos, me orientou, com apoio e amizade.

À Profa. Dra. Iara M. S. De Luca, por sua dedicação e apoio na orientação da parte de histologia desse trabalho.

Aos Profs. Drs. Júlia K. Sakurada, Leonilda M. B. Santos, Irineu J. B. de Camargo, Dagmar R. Stach-Machado, pela análise prévia do trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelas informações obtidas em sala de aula.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Aos amigos da pós graduação.

Aos técnicos do departamento de Histologia.

Aos amigos do CEMIB.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pelo incentivo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o andamento dos trabalhos

Dentro sem fora

A vida está
dentro da vida,
em si mesmo circunscrita,
sem saída.

Nenhum riso,
nenhum soluço
rompe
a barreira de barulhos.

A vasão
é para o nada.
Por conseguinte,
não vasa.

Ferreira Gullar

SUMÁRIO:

INTRODUÇÃO.....14

MATERIAL E MÉTODOS: 31

SANGRIA E INOCULAÇÕES 31

TRANSPLANTE CARDÍACO ECTÓPICO..... 32

ANÁLISE MACROSCÓPICA 34

ANALISE HISTOLÓGICA 34

RESULTADOS: 38

INFLUÊNCIA DO SANGUE NO ALOTRANSPLANTE..... 38

Avaliação Macroscópica..... 38

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS LOCAIS DE TRANSPLANTE 43

DISCUSSÃO: 53

CONCLUSÕES:.....62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....63

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1: Marcação individual dos animais 35

Figura 2: Inoculados com sangue V.I. ou V. O.....36

Figura 3: Inoculados com salina V. I. ou V.O. 37

Figura 4: Avaliação macroscópica do tempo de sobrevivência do transplante.....42

Prancha I

A) Aspectos histológicos do coração normal isolado de um camundongo recém-nascido, ou inserido numa orelha de camundongo adulto.

Figura 5:

Figura 6:

Figura 7: :.....46

Prancha II:

B) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 10 dias de transplante.

Figura 8:

Figura 9:

Figura 10: 48

Prancha III: C) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 15 dias de transplante.

Figura11:

Figura 12:

Figura 13: 50

Prancha IV:

D) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 20 dias de transplante.

Figura 14:

Figura 15:

Figura 16:

Figura 17: 52

Tabela I: Perfil das Observações Macroscópicas dos Animais Transplantados.....**40**

Tabela II: Viabilidade do órgão visualizado.....**41**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

A - Linhagem isogênica de camundongos A/J de haplótipo H-2^a

A.C. - Antes de Cristo

ALS - Soro Anti-Linfocitário

B6 - Linhagem isogênica de camundongos C57BL/6 de haplótipo H- 2^b

CD - " Cluster of Differenciation" ou Marcadores de membrana celular

CSA - Ciclosporina A

D.C. - Depois de Cristo

FK 506 - Drogas imunossupressoras

H2 - Complexo Principal de Histocompatibilidade Murino

HE - Hematoxilina e Eosina

HLA - Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano

IFN γ - Interferon gama

Ig A - Imunoglobulina A

Ig G - Imunoglobulina G

Ig M - Imunoglobulina M

IL - Interleucina

MBP - Proteina Básica de Mielina

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK - " Natural Killer"

PBS - Solução tampão de fosfato

Th1 - Células T "helper" 1

Th2 - Células T "helper " 2

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNFα - Fator de Necrose Tumoral alfa

V. I. - Via Intravenosa

V.O. - Via Oral

RESUMO:

O conhecimento sobre a tolerância associada à prática de transfusão sangüínea que antecede alguns alotransplantes ainda é bem limitado. Utilizando-se um modelo de alotransplante em camundongos, investigou-se a importância da via de administração do sangue do doador sobre a manutenção do órgão transplantado, observando-se os aspectos macroscópicos e histopatológicos.

Camundongos machos A/J (A) de haplótipo H-2^a, usados como receptores, foram inoculados com salina ou sangue de machos de linhagem doadora C57BL/6 (B6) de haplótipo H-2^b, pelas vias intravenosa (V. I.) e oral (V.O.). Após uma semana grupos de 10 animais receberam auto ou alotransplantes na orelha com tecido cardíaco de recém-nascidos (A) e (B6), e foram observados quanto ao aspecto macroscópico da inflamação e o batimento cardíaco. Em dias determinados (5, 10, 15 e 20), retirou-se as orelhas contendo o transplante para estudos histopatológicos.

Dados macroscópicos permitiram distinguir algumas características inflamatórias da rejeição ou aceitação do transplante. O monitoramento do batimento cardíaco dos tecidos transplantados foi realizado como um dos indicadores da sobrevivência dos transplantes. Assim, nos alotransplantes de animais inoculados com sangue por via oral os batimentos cardíacos foram observados durante 5 dias e o tecido cardíaco permaneceu visível até o 20º dia, enquanto nos alotransplantes de animais inoculados por via intravenosa os batimentos cardíacos foram observados durante 2 dias e o tecido permaneceu até o 15º dia. Nos animais submetidos aos isotransplantes, os batimentos cardíacos foram observados de forma permanente por mais de 100 dias.

Na análise histopatológica, a observação dos infiltrados celulares e tecidos associados definiram o perfil de aceitação e rejeição do transplante. As alterações resultantes da inoculação do sangue permitiram sugerir que havia uma redução da rejeição quando o sangue foi administrado pela via oral, e uma aceleração da rejeição quando o sangue foi administrado pela via intravenosa. Nos isotransplantes, a aceitação do tecido cardíaco foi marcada por uma inserção homogênea do tecido transplantado e ausência de infiltrados celulares, caracterizando a isogenia dos camundongos da linhagem receptora.

INTRODUÇÃO

O estudo da aloimunização representa hoje, uma das abordagens de interação do conhecimento biológico-médico das mais promissoras para a afirmação da Imunologia como uma ciência precisa tanto na sua fundamentação básica como na sua aplicação clínica.

A aloimunidade é compreendida como a resposta imune de um indivíduo de uma espécie contra um antígeno de outro indivíduo da mesma espécie. Os principais sistemas alotípicos estão associados às hemácias, ao complexo principal de histocompatibilidade e às imunoglobulinas humanas. A aloimunização propriamente dita pode ser observada no homem em situações particulares como: em casos de gravidez, nas transfusões sangüíneas ou nos transplantes de órgãos. Nessas condições, uma imunização se produz contra um ou mais aloantígenos presentes nas células de um indivíduo doador ou nas substâncias que estas células secretam, que normalmente estão ausentes no indivíduo receptor. As conseqüências dessa manifestação imune poderão aparecer respectivamente, em alguns casos a partir de uma segunda gravidez, após transfusões sangüíneas repetidas, ou passados alguns dias ou semanas da realização de um transplante (CORDELIER, 1984).

Um denominador comum nesses processos de aloimunização diz respeito às diferenças entre os indivíduos, normalmente representadas pelo polimorfismo genético no seio de uma mesma espécie animal.

Entre os primeiros relatos alusivos aos transplantes fala-se de intervenções lendárias feitas na China entre os séculos 2 A.C. e 2 D. C., com destaque para o médico PIEN CH'IAO que teria realizado cirurgias sem dor e, o mais

extraordinário, havia trocado corações de pacientes. Também na China, o médico HUAN T' fez transplantes de tecidos e órgãos (TIZARD, 1995).

Em relatos do ocidente aparecem entre outros a figura de TAGLIACOZZI, (1597) cirurgião de Bologna, que escreveu: "a caraterística singular do indivíduo leva-nos a uma total dissuasão da possibilidade de realizar este trabalho (um transplante de tecido) em uma outra pessoa". Ele se fundamentara no sucesso da reparação de um nariz no qual havia feito um autoenxerto, tendo usado um pedaço de tecido retirado do braço do próprio paciente (um procedimento ainda empregado até hoje); em detrimento de procedimentos similares realizados com doadores alogeneicos, que resultaram em insucessos. Não se sabe o que estimulou TAGLIACOZZI escrever nessas palavras uma previsão de, exatamente três séculos antes de serem firmemente estabelecidas as bases biológicas da individualidade. A medicina ainda vivia uma mistura curiosa de ciência primitiva e superstição, existindo portanto muitas histórias de transplantes de tecido. Casos de transplantes miraculosos foram registrados, como o dos Santos Cosme e Damião, dois mártires do cristianismo, que retiraram a perna de um doador da raça negra recém morto implantando-a em um receptor da raça branca que sofrera amputação (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Era grande o fascínio do homem pela possibilidade de recuperação das funções perdidas de órgãos deficientes ou doentes. HUNTER, (1750) realizando trabalhos nessa abordagem, inclusive com transplantes de dentes molares, lançou a teoria do "principio vital" na qual sugeria que o enxerto seria mantido vivo pelo "suco" tissular do receptor, até que a vascularização chegasse ao enxerto (APUD SILVERSTEIN, 1989).

O espaço de tempo compreendido entre o final do século passado e o

inicio do século XX foi marcado por grandes avanços da Microbiologia e Imunologia e naturalmente da Medicina, fundamentados especialmente pela visionária Teoria dos Germes formulada por LOUIS PASTEUR, (1887). Em paralelo com os estudos de tantos pesquisadores ilustres que desvendaram as bases das teorias celular e humoral da imunidade, muitas foram as investigações voltadas para o entendimento da transplantação de tecidos, vinculadas principalmente aos estudos com modelos experimentais de tumores. Esses trabalhos representando uma década de investigação, foram sumarizados em um livro de GEORG SCHÖNE. Nele, o autor com base em mais de 500 referências, deixou claro que as pesquisas em tumores tinham já estabelecido em 1912 as regras gerais que governavam a aceitação ou rejeição de transplantes de tumores. Sugeriu inclusive o termo "imunidade dos transplantes", na crença de que as bases dessas regras estavam no contexto da imunologia, o que resultou nas "leis dos transplantes" como entendemos ainda hoje:

1- O transplante entre espécies diferentes (heteroplástico = xenogeneico) invariavelmente é rejeitado.

2- O transplante entre membros não relacionados da mesma espécie (homoplástico = alogeneico) usualmente é rejeitado.

3- O autoenxerto invariavelmente será sempre aceito.

4- O transplante primário em um receptor alogeneico será rejeitado tardiamente.

5- Um segundo transplante em um receptor que tinha rejeitado um transplante do mesmo doador, ou de um primeiro transplante em um receptor que tinha sido pré-imunizado com material do doador do tumor, terá uma rejeição acelerada.

6- Um íntimo "relacionamento sangüíneo" entre doador e receptor, favorece a aceitação do transplante (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Nos processos de transfusões sangüíneas, que a séculos o homem vem estudando as suas dúvidas (LEGRAND, 1988; WICK, 1989), também ocorre reações de aloimunização como nos transplantes.

Por volta do ano de 1900, KARL LANDSTEINER descobriu os grupos sangüíneos a partir da demonstração de diferentes isoaglutininas ocorrendo naturalmente nas hemácias humanas, denominando de sistema ABO. Com a continuidade desses estudos por LANDSTEINER e por diversos pesquisadores, outros sistemas de marcadores alogeneicos dos eritrócitos foram identificados, como os sistemas Rhesus, Lewis, Kell, Duffy, etc., numa relação que hoje já ultrapassa mais de 30 marcadores. Tais estruturas alogeneicas obedecem um controle genético para sua expressão e são considerados como potenciais antígenos para a estimulação de aloimunidade. Assim o sucesso das transfusões sangüíneas dependeria dos grupos eritrocitários do doador e do receptor. LANDSTEINER na sua conferência do Prêmio Nobel, em 1931, levantou a hipótese que análogos dos eritrócitos poderiam estar implicados no sucesso dos transplantes de outros tecidos (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Motivados pelo envolvimento genético dos achados com tumores experimentais e dos marcadores eritrocitários, muito foi investido pelos geneticistas. GEORGE D. SNELL, (1935) preocupado com a homogeneidade genética dos animais de laboratório, na busca de uma linhagem de camundongos isogênicos, desenvolveu junto ao Laboratório Jackson, nos Estados Unidos, a criação de linhagens de camundongos congênitos. E assim pôde descobrir um locus intimamente relacionado

com a rejeição de transplantes que ele chamou de H (para histocompatibilidade). Simultaneamente na Inglaterra, PETER GORER descobriu um anticorpo hemaglutinante para um marcador denominado de antígeno II cujo gene estaria localizado no locus H definido por SNELL, surgindo assim a nomenclatura H-2 que representa o complexo principal de histocompatibilidade do camundongo (APUD SILVERSTEIN, 1989).

A presença desse mesmo complexo gênico em humanos foi descoberto progressivamente, e em 1958, JEAN B. G. DAUSSET descreveu um antígeno leucocitário ao qual estavam vinculadas numerosas especialidades. O conjunto foi chamado de HLA, mas apenas em 1965 DAUSSET, por um lado e VAN HOOD por outro, demonstraram que esses antígenos intervinham nos mecanismos de rejeição de transplantes. Estudos de BENACERRAF, 1967 ampliaram o significado do sistema MHC estabelecendo que os genes deste complexo controlavam a habilidade de um animal montar uma resposta imune para um antígeno (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Fica notório que as transfusões sangüíneas antecederam qualquer conhecimento sobre os grupos sangüíneos (ABO) e fator Rh, bem como os transplantes clínicos começaram antes de se conhecer o complexo principal de histocompatibilidade representado pelo HLA em humanos e pelo H-2 em camundongos (MÖLLER *et al.*1985). Em conseqüência destes fatos, muitos pacientes morreram por hemólise nas transfusões incompatíveis, e foram muito freqüentes os fenômenos de rejeição nos transplantes alogeneicos.

Por ocasião da segunda guerra mundial a perda de um grande contingente de soldados que apresentavam óbito com queimaduras graves, após a realização de inúmeros transplantes de pele foi o que impulsionou o estudo dos transplantes no tempo

contemporâneo, embora as tentativas de transplantação remontem à antigüidade. Foi nesse contexto que PETER MEDAWAR ficou interessado pelos transplantes de pele, sendo convocado pelo Comitê de Guerra Britânico para explorar a questão, primeiramente associado à investidas clínicas com THOMAS GIBSON, ou então usando animais de experimentação no seu laboratório. Em trabalho descrevendo experimentos sobre uma vítima de queimaduras através de biópsias seriadas, GIBSON e MEDAWAR, (1943), reafirmaram informações importantes do comportamento de autotransplantes, homotransplantes e alotransplantes, e destacaram a pouca evidência de uma estrita "reação celular local" nos processos de rejeição. Esses dados também permitiram aos autores sugerir sobre a participação de mecanismos ativos de imunização na destruição da epiderme estranha (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Em trabalhos subsequentes, MEDAWAR, (1945), cuidadosamente definiu os parâmetros pertinentes de tempo, dosagem, especificidade, 1º e 2º eventos de rejeição, bem como as mudanças clinicas e histológicas que acompanham a rejeição de transplantes. Nesses estudos havia redescoberto as leis da transplantação e, mais que isso, tinha convincentemente demonstrado que o processo de rejeição se originava sistemicamente e não localmente. Em 1946, MEDAWAR demonstrou que na rejeição do transplante de pele não existe a formação de anticorpos contra os eritrócitos do doador; por outro lado a imunização com hemácias do doador não conferia uma imunização significativa contra a pele, como aquela obtido pelos leucócitos do doador; e que a inoculação intradérmica de leucócitos era 18 vezes mais efetiva que a imunização pela via intravenosa (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Entre outros estudos de MEDAWAR, são destacados: a noção de que a imunidade podia ser induzida por células mortas e mesmo por extratos celulares, abrindo

assim a possibilidade de transplantes com tecido morto, e a observação da reação do enxerto-contra-hospedeiro MEDAWAR *et al.*, (1956). Enfim, com base no balanço das evidências sugeria MEDAWAR *et al.*, (1957) que a imunidade no transplante de pele e as reações de hipersensibilidade do tipo tardia eram reações fundamentalmente celulares e não humorais, e que dependiam da ativação, expansão e engajamento periférico das células linfóides (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Um dos trabalhos mais importantes para o caráter imunológico dos transplantes, foi o realizado por OWEN *et al.*, (1945), sobre as conseqüências imunológicas de anastomoses vasculares naturais estabelecidas entre bezerros gêmeos no útero materno. OWEN mostrou por testes sorológicos que esses animais eram quimeras de eritrócitos, pois possuíam misturas das próprias hemácias com as hemácias do seu gêmeo, porem não produzia isoanticorpos contra os componentes estranhos. Foi no laboratório de MEDAWAR, (1952, 1953) que se demonstrou entre os dois bovinos, a ausência de rejeição de pele de um para o outro, reforçando a idéia do fenômeno de tolerância imunológica (APUD SILVERSTEIN, 1989).

Com o conhecimento das bases genéticas que determinam o processo de aloimunização, temos hoje definido que em função do polimorfismo genético de uma mesma espécie animal (diferentes sistemas como MHC, ABO e outros antígenos menores), os transplantes de tecidos ou órgãos provenientes de um doador geneticamente diferente (alotransplante) irão induzir uma reação de imunidade específica provocando uma reação inflamatória que culmina com a destruição do tecido transplantado - a reação de rejeição. Esse quadro de rejeição pode ser evidenciado com diferentes manifestações clínicas e histopatológicas que foram nomeados como: as rejeições hiperagudas são mediada por anticorpos preexistentes; as rejeições agudas são

mediadas por anticorpos e células produzidos contra o transplante; as rejeições crônicas são mediadas em geral pelo misto da presença de anticorpos e de reações celulares contra o transplante (APUD SILVERSTEIN, 1989)

Rejeições hiperagudas foram observadas quando se iniciaram os transplantes de órgãos porquanto não se levava em consideração o sistema ABO (STARZL *et al.* 1964). As barreiras do sistema ABO muitas vezes podem ser as responsáveis pelo insucesso dos transplantes de rim, fígado ou coração (FISCHEL *et al.* 1989). Em transplantes com incompatibilidade sangüínea, RAMSEY *et al.*, (1984), observaram hemolises na maioria dos pacientes, provocada por uma reatividade contra o transplante.

A rejeição hiperaguda pode ocorrer após a anastomose entre os vasos do órgão transplantado, ocasionado pela presença de anticorpos pré-existentes do receptor contra as células endoteliais do enxerto que podem expressar tanto MHC de classe I quanto MHC de classe II. A rejeição aguda que resulta de uma resposta imune ativa, pode ocorrer dentro de dias ou semanas após o transplante. A rejeição crônica pode ser caracterizada pela fibrose tanto a nível vascular quanto intersticial. A causa da fibrose pode ser devido a repetidos surtos de rejeição aguda com substituição de tecido necrosado por tecido fibroso (NEUBERGER & ADAMS, 1993). No processo inflamatório agudo de um transplante ocorre o envolvimento de INFγ e TNF, provavelmente responsáveis pelo aparecimento de infiltrado mononuclear (LIN *et al.* 1993).

Segundo SCHULZ *et al.*, (1995), a proporção de células CD8 e CD4 no local do transplante, por ocasião de uma rejeição aguda pode ser de 3:1.

Estudos mais recentes sugerem que em xenotransplantes, a rejeição hiperaguda pode ser acelerada, principalmente pela presença de anticorpos da classe IgM reativos com as substâncias estranhas e posterior ativação do sistema complemento (Hori *et al.* 1997).

As reações imunológicas que ocorrem em transplantes são principalmente do tipo celular e não humoral, com o envolvimento de células T, no local do transplante. Predominam as células T CD4+ CD8-, com prevalência do circuito Th1 devido a ativação celular ocorrida (SHIRWAN *et al.*, 1993).

Durante um certo período, também se constatou que as principais causas do fracasso dos transplantes não eram as rejeições e sim a má preservação dos órgãos do doador até chegar ao receptor, circunstâncias que propiciam desde infecções até complicações vasculares como anastomoses e conseqüentes isquemias. O uso de crioprotetores e outras drogas para a preservação dos órgãos, têm diminuído esses entraves (NEUBERGER & ADAMS, 1993). Conhecidas as condições ótimas de manutenção dos órgãos a serem transplantados, os cirurgiões têm-se aperfeiçoado quanto às técnicas cirúrgicas (LAFFERTY *et al.*1983; HEDRICH, 1990; LIN *et al.* 1993). Entretanto persiste ainda o desafio representado pela barreira rejeição, que deve ser evitada ou minimizada. (TANAKA *et al.* 1993; LAZAROVITS *et al.*1993).

A rejeição não tem sido considerada o principal problema numa série de transplantes de fígado. A principal causa tem sido atribuída às infecções decorrentes do uso de imunossupressores. Estudos recentes apontam para o não funcionamento inicial do órgão que resultam em complicações vasculares (NEUBERGER & ADAMS, 1993).

Nos transplantes ectópicos e de pele, tem sido considerada uma rejeição

quando a perda do tecido transplantado ocorre após o quinto ou sétimo dia. Se houver perda de tecido antes desse período, poderá ser por falhas cirúrgicas, má conservação dos órgãos ou infecções. Em animais isogênicos, são considerados aceitos após cem dias da sobrevivência do órgão ou pele transplantados (LAFFERTY *et al.* 1983; HEDRICH, 1990).

Há hipóteses que reações vigorosas de rejeição a aloenxertos, geralmente resultam do reconhecimento dos tecidos transplantados, tanto por linfócitos T $CD4^+$, quanto por linfócitos T $CD8^+$. Estima-se que de 1 a 10% dos linfócitos T de um hospedeiro, são capazes de reconhecer e responder às moléculas do MHC estranho ou ao peptideo que essas albergam (JANEWAY JR *et al.*1997). Na maioria das vezes torna-se impossível dizer se existe ou não uma agressão autoimune nesse ou naquele órgão ou tecido, a não ser pela constatação de lesões histológicas (VAZ *et al.*1993).

Atualmente, antes da realização dos alotransplantes em humanos, além da tipagem sangüínea com destaque para o sistema ABO, estuda-se a compatibilidade genética da população celular do doador em relação à do receptor, através da sorotipagem (cross-match) e da cultura mista de linfócitos. Se o órgão é de cadáver, no caso de transplante cardíaco, as avaliações levadas em conta são apenas do tipo sangüíneo, com posterior tratamento com imunossupressores para que o receptor possa tolerar o enxerto (NEUBERGER & ADAMS, 1993).

Conhecedores portanto das limitações para a definição de uma completa compatibilidade entre doador e receptor, restam as buscas de manobras que possam minimizar essas diferenças. Abrem-se assim, as possibilidades do estudo de tolerância natural com o intuito de induzi-la artificialmente, surgindo a prática das transfusões

sangüíneas como estratégia para a tolerância. Outra forma de resolver o problema tem sido a manipulação à base de radiação ou quimioterápicos visando imunossupressão. Assim muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de atingir uma tolerância dos transplantes, em caráter preventivo e/ou para a sua manutenção profilática (TIZARD, 1995).

Existem no homem e em outros animais, locais do corpo onde as conseqüências de uma aloimunização são em geral pouco significativas - uma situação de tolerância natural. São os casos associados com: o esperma alogeneico que pode atingir o trato reprodutivo feminino sem provocar uma resposta imune; transplantes em locais privilegiados como a córnea e câmara anterior do olho, pois, em função da ausência de drenagem linfática, qualquer reação é menos intensa; e na gravidez, onde geralmente a destruição do feto pode ser prevenida pela atividade combinada de vários mecanismos imunossupressivos. Neste último caso, uma reação alogeneica poderá ocorrer a partir da segunda gravidez, quando a mãe Rh(-) já estiver sensibilizada por um filho Rh(+), resultando no quadro da eritroblastose fetal (TIZARD, 1995).

O estudo da tolerância iniciou-se com observações registradas por DAKIN, publicadas em 1829, do que acontecia com as populações de índios norte-americanos que ingeriam pequenas doses de uma planta anacardiácea, evitando, com esse procedimento, a reação de hipersensibilidade em contato posterior com o veneno. Sem dúvida outras práticas similares eram realizadas na prática popular sem o devido conhecimento. Com o bem sucedido transplante de pele realizado entre os gêmeos bovinos, outros trabalhos de MEDAWAR sobre tolerância, permitiram demonstrar que os animais se tornavam imunologicamente tolerantes a tecidos estranhos durante o desenvolvimento embrionário, e não produziam respostas imunes face aos mesmos

MEDAWAR, (1953) (APUD SILVERSTEIN, 1989).

A supressão de resposta imune pode ser uma forma de reatividade ao antígeno, e não uma falta de resposta. Esta pode se manifestar silenciosa, quando o organismo entra em contatos repetidos com materiais que lhe são familiares (embora "estranhos") e são processados sem que se induza a formação de mais anticorpos ou se exacerbe a divisão de linfócitos acima de um nível basal. O organismo só pode se tornar tolerante a materiais aos quais pode também se imunizar. Na tolerância, o corpo reconhece o antígeno imunologicamente, embora este reconhecimento não cause uma modificação sensível nas operações que já ocorriam no sistema antes de sua chegada (VAZ, 1981).

Em 1946, MERRIL CHASE estabeleceu a natureza imunológica da tolerância oral. Sabe-se hoje, que uma parte das proteínas que ingerimos como alimentos pode penetrar na circulação em forma antigenicamente ativa, mas a importância que isso pode ter na operação global do sistema imune, tem sido pouco estudada (VAZ *et al.*1993).

CARR *et al.*, (1995), estudaram o efeito da administração de células esplênicas pela via oral ou diretamente na veia porta do fígado, antecedendo um alotransplante de rim em ratos. Os resultados obtidos demonstraram que, por ambas as vias, era possível a indução de tolerância, havendo um aumento na permanência do órgão transplantado. Em outros estudos, tem-se confirmado que o contato oral com um antígeno, especialmente se este for feito antes ou imediatamente após uma imunização paralela, promoverá uma tolerância (CONDE *et al.* 1998).

É sabido hoje que a tolerância poderá ser estabelecida através de diferentes mecanismos. Um desses mecanismos, a deleção clonal, parece ser estimulada

com uma transfusão sangüínea onde ocorre uma diminuição das células exterminadoras naturais (NK) ativas, explicando com isso o aumento de tolerância. Quanto à supressão ativa ou regulação imunológica, um papel importante é desempenhado pelas células T $CD4^+$, que agem em circuitos de ativação como dois subgrupos Th1 e Th2. Th1 responde pela ativação celular realizada pela ação das interleucinas IL-2, TNFα e IFNγ. As Th2 no entanto, respondem pela estimulação da resposta imune humoral com as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 ou IL-10. Um circuito Th poderá, geralmente, suprimir o outro. Em transfusão sangüínea ocorre uma participação predominante do circuito Th2, sugerindo uma atividade imunológica humoral. Na anergia, o que pode ocorrer é uma não reatividade das células do hospedeiro. Em experimentos *in vitro,* com transfusão sangüínea, tem sido observado que a interleucina IL-10 pode ser responsável pela supressão ativa de Th1 e também pode prevenir a expressão de CD80, que é um coestimulador de macrófagos. Pouco se sabe o que ocorre *in vivo* (DZIK *et al.* 1996).

Um dos fatores de grande importância para a prática dos transplantes, será sempre a possibilidade de se assegurar a permanência do tecido ou órgão tolerado e ou aceito pelo hospedeiro. Na prática clinica, a tentativa de minimizar as rejeições, tem sido feita com o emprego de técnicas imunossupressoras. Uma das técnicas mais amplamente usadas, envolve drogas ou irradiação, que inibindo a divisão celular, reduz a multiplicação de células sensíveis ao antígeno. Embora eficazes, essas técnicas tem em comum a inespecificidade e o caracter tóxico. (TIZARD, 1995).

Embora a radiação com raios X seja usado para manter vários tipos de transplantes experimentais, ela é usualmente necessária para irradiar com antecedência pacientes que serão submetidos a transplantes, por exemplo o de medula óssea.

Os corticosteróides são os quimioterápicos mais amplamente usados na prevenção da rejeição dos transplantes. Drogas citotóxicas como: ciclofosfamida,

azatioprina, metotrexato, são potentes imunossupressores porém são muito tóxicas (SILVERSTEIN, 1989). A partir dos anos 80 foi introduzida na clínica médica, o uso da ciclosporina A, considerada como importante droga capaz de provocar uma imunossupressão mais seletiva (NEUBERGER & ADAMS, 1993). Recentemente apareceu a droga FK506, que também é mais seletiva e apresenta uma ação tóxica menor.

Outra técnica possível para se induzir tolerância, é através da eliminação seletiva de células T. Isto pode ser feito por meio de soro específico anti-célula T (ALS) ou por anticorpos monoclonais (anti-CD3, anti- CD4, anti-receptor de IL2, etc.) (SILVERSTEIN, 1989).

Uma terceira abordagem técnica para se impedir a rejeição de um transplante, diz respeito à manipulação do controle da resposta imune normal, amplamente questionada no momento.

A administração de transfusões sangüíneas em pacientes potenciais para alotransplantes foi praticada durante muitos anos, observando-se uma melhoria no processo de rejeição. Esta prática, embora desencorajada por algum tempo, mostrou em diferentes experiências que as transfusões múltiplas feitas antes da transplantação, aumentava a sobrevivência do transplante por um ano em, até 50% em alguns indivíduos quando comparados com indivíduos transplantados, mas sem transfusões preliminares (SPEES, et al 1981).

Um possível mecanismo de tolerância gerado pelo efeito da transfusão, ainda não está definido, sabendo-se apenas da necessidade da presença de leucócitos. WOOD *et al., (*1988) demonstraram alterações na produção de interleucinas, em especial a IL-2. LIEBERMAN *et al.,* (1990) empregando camundongos com neuroblastomas obtiveram resultados de imunossupressão resultante de transfusão sangüínea. Outros

autores tentaram esclarecer sobre o mecanismo envolvido na participação do complexo principal de histocompatibilidade em humanos (HLA) e em camundongos (H2) (LUDWIN & SINGAL, 1988; BUMGARDNER *et al.* 1992). KOKA *et al.*, (1993) descreveram um outro fator capaz de aumentar a sobrevivência de transplantes renais em alguns pacientes com determinado padrão de nefropatia, que é a presença de anticorpo IgA- anti HLA.

Em pacientes renais crônicos, à espera de transplantes, as sucessivas transfusões a que eles são submetidos têm beneficiado a aceitação dos mesmos (BLUMBERG *et al.* 1995). Os transplantes têm sido beneficiados, através do emprego simultâneo de medicamentos imunossupressores (LASEK *et al.* 1988) e ou transfusões (TERAZAKI, 1989; CUTURI *et al.* 1994; SAITOVITCH *et al.* 1996; MIYANARI, 1997).

Em estudos realizados com camundongos isogênicos de linhagens alogenicamente opostas, a C57BL/6 ($H\text{-}2^b$) como doadora e a linhagem BALB/c ($H\text{-}2^d$) como receptora, DIZIK *et al.*, (1996) mostraram que nos animais que receberam transfusões sangüíneas e a seguir foram inoculados de células tumorais, o crescimento dessas células foi maior do que em animais que não receberam sangue, sugerindo que a transfusão induziu uma imunomodulação.

Alguns trabalhos *in vitro,* mostram que as células vermelhas do sangue, podem estimular células T normais de murinos e humanos a proliferarem e liberarem IL2 (BARKER & ELSON, 1994).

Poucos são os imunologistas que trabalham com sangue total. Vêm se inoculando células e ou anticorpos anti-células, como: células tímicas, esplênicas, anti-CD4 e anti-CD8, na tentativa de induzir tolerância a transplante (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*1992; LAZAROVITS *et al.* 1993; CARR *et al.* 1995). Mas mesmo com

o surgimento da AIDS, as transfusões são peças importantes na indução de tolerância, pois o paciente a espera de um transplante, seja renal, cardíaco, de fígado ou de pele, muitas vezes necessita receber transfusões para sobreviver (DZIK *et al.* 1996).

Desvendar o que uma transfusão sangüínea causa no hospedeiro é um desafio, porquanto o fenômeno de tolerância ainda é uma incógnita. Com base nessa expectativa e frente às evidências descritas, o presente trabalho tenta determinar qual a melhor via de inoculação de sangue na indução de tolerância a um transplante ectópico, avaliando-se o tempo de permanência do tecido transplantado assim como as características da manifestação celular e tecidual.

Objetivos:

Na tentativa de esclarecer sobre a importância da inoculação de sangue na indução de tolerância para alotransplantes, o presente trabalho teve como objetivos:

- Verificar a viabilidade da utilização como modelo experimental, camundongos de duas linhagens isogênicas com haplótipos distintos, definidas como doador e receptor do transplante.
- Administrar diferentes dosagens de sangue, do doador para o receptor, pelas vias intravenosa e oral, num espaço de tempo anterior à realização do transplante ectópico de tecido cardíaco na orelha.
- Analisar os aspectos macroscópicos do local do tecido transplantado, com ênfase no acompanhamento do batimento cardíaco.
- Acompanhar os aspectos histopatológicos, em cortes de orelha, associados com o local de inserção do transplante, correlacionando a arquitetura do tecido com aceitação dos isotransplantes ou rejeição dos alotransplantes.

MATERIAL E MÉTODOS:

Modelo Experimental

Animais: Camundongos isogênicos das linhagens C57BL6 (B6) H- 2^b e A/J (A) H-2^a, machos adultos de 8 a 12 semanas e recém-nascidos de um dia, foram fornecidos pelo Centro Multi Institucional de Bioterismo (CEMIB), da UNICAMP.

Planejamento: Os camundongos recém-nascidos, de linhagens (B6) e (A), serviram como doadores de tecido cardíaco. Animais de 8 a 6 semanas, da linhagem (B6), doadores de sangue. Os animais da linhagem (A), utilizados como receptores de sangue/solução de salina fisiológica e posteriormente do tecido cardíaco transplantado, foram identificados com uma marcação auricular segundo a convenção, na orelha contrária àquela do transplante, visando um acompanhamento individual (Figura 1). Os esquemas relacionado a esses procedimentos, encontram-se nas Figuras 2 e 3.

Sangria e Inoculações

Procedimento

O sangue de camundongos da linhagem B6, foi coletado por punção cardíaca, usando-se uma solução contendo anticoagulante a base de citrato de sódio, proveniente de estoques padrões para transfusões humanas. A mistura do sangue de 20 animais era a seguir separada em alíquotas em condições assépticas, realizando-se imediatamente uma cultura desse sangue em meio rico para microorganismos. Algumas alíquotas eram mantidas a temperatura de geladeira a 5°C por um período igual ou

superior a duas semanas antes da sua utilização. Outras alíquotas eram liofilizadas e também mantidas à temperatura de geladeira até o momento do uso. As preparações de sangue estavam liberadas para uso desde que conferida a sua esterilidade.

As inoculações, tanto via oral (V.O.) quanto a intravenosa (V.I.), foram efetuadas por quatro dias consecutivos, com descanso de sete dias e posterior transplante.

Pela V.O. foi inoculado 0,5ml de sangue com um tempo de armazenamento igual ou superior a duas semanas ou sangue reconstituído, por animal /dia, usando como sonda esofagiana um tubo de polietileno.

Pela V.I. foi inoculado 0,1ml de sangue com um tempo de armazenamento igual ou superior a duas semanas, por animal /dia, na veia da cauda, com uma seringa de tuberculina.

Transplante Cardíaco Ectópico

Os transplantes cardíacos ectópicos foram realizados com base no método de FULMER *et al.*, (1963) modificado por RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, (1992). Em linhas gerais, o tecido cardíaco originário de doadores recém-nascidos de um dia, foram implantados em condições assépticas na orelha de camundongos adultos de 8 a 12 semanas. Os seguintes procedimentos foram assim realizados:

Obtenção do tecido cardíaco:

Camundongos recém-nascidos de um dia, linhagem A ou B6 foram anestesiados em gelo e o coração retirado assepticamente com o auxilio de uma pinça anatômica de ponta curva, sendo separado o ventrículo do átrio e mantido em salina a 0,15M à 4°C.

Transplante:

Os camundongos receptores da linhagem A foram anestesiados com éter etílico. A pequena incisão na base da orelha foi feita com lâmina de barbear ou lâmina de bisturi sem corte, esterilizadas, posteriormente foi feito divulcionamento da região com o auxilio de uma pinça e com leve escoriação nos vasos, foi provocado aumento da vascularização na região e implantado o tecido cardíaco, retirado o ar da região com leve toque, fechada a incisão com precionamento da pinça anatômica.

Análise Macroscópica

Com o auxílio de uma lupa os corações transplantados foram observados diariamente, registrando-se as alterações ocorridas como:

a) vascularização;

b) tonalidade do coração transplantado;

c) presença ou não de edema;

e) batimentos cardíacos;

f) necroses;

g) diminuição do coração transplantado;

Analise Histológica

Sacrifício dos animais:

Os animais foram sacrificados nos dias 5, 10, 15 e 20, retiradas as orelhas com o órgão transplantado, identificadas e fixadas em formol a 10% no mínimo 24 horas.

Após fixação, os materiais foram processados, as peças sofreram a desidratação em banhos de álcool com intervalos de 45 minutos cada um, iniciando pelo álcool 70% até três banhos de álcool absoluto. Foi feita uma seqüência com intervalo de 30 minutos cada uma de xilol/álcool(1:1), xilol e xilol/parafina(1:1) e uma impregnação final em parafina pura por 4 horas.

As peças histológicas foram então incluídas manualmente em parafina, nas posições de corte. Cortes seriados de 6μm, montados em lâminas e corados pelo método Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson.(JUNQUEIRA *et al.* 1983 e BECAK *et al.* 1976).

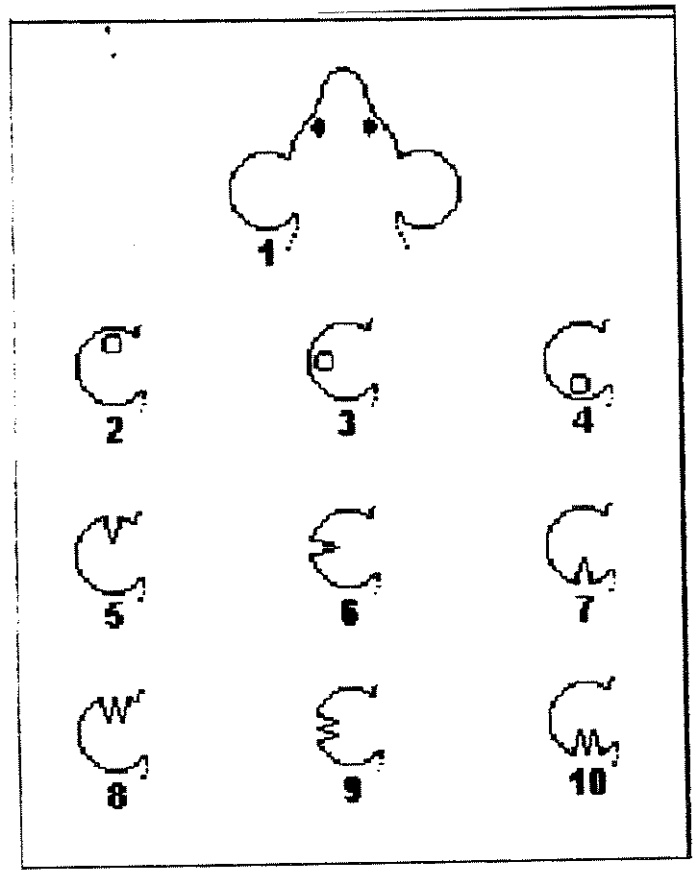


Figura 01: Marcação individual dos animais

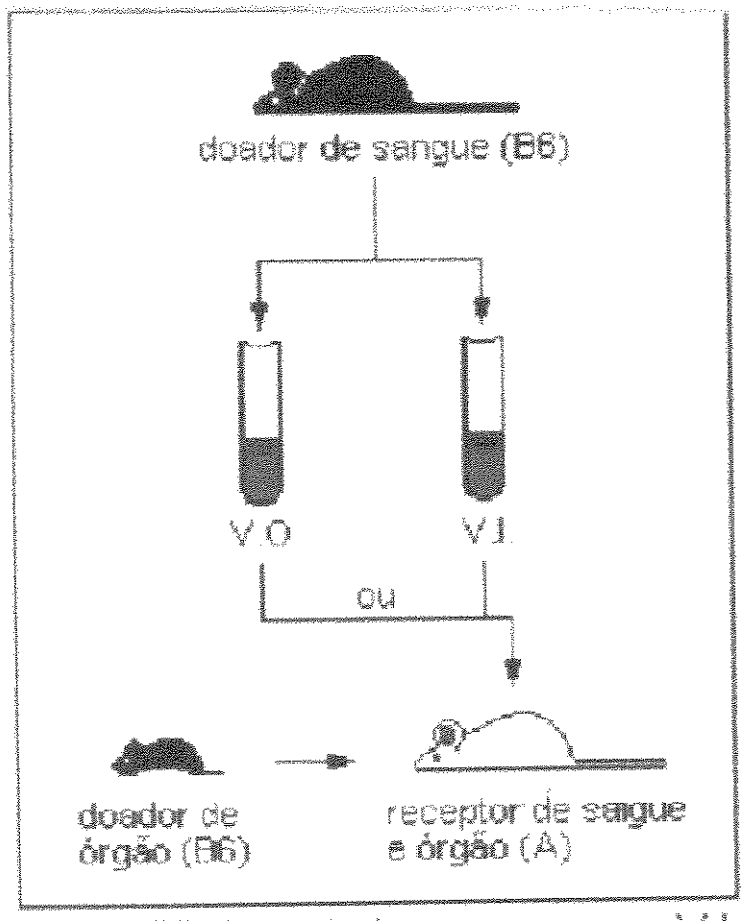


Figura 02: Inoculados com sangue V.I. ou V.O.

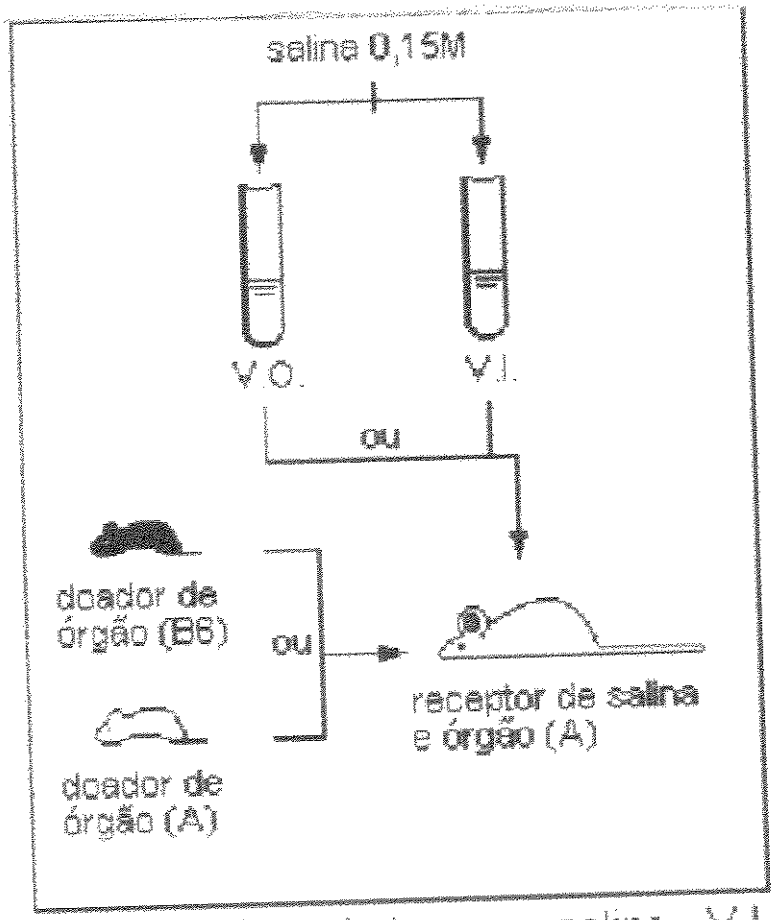


Figura 03: Inoculados com salina V.I. ou V.O.

RESULTADOS:

Influência do Sangue no Alotransplante:
Avaliação Macroscópica

Os camundongos A/J (A) de haplótipo H-2^a utilizados como receptores foram previamente submetidos a um tratamento com um *pool* de sangue de camundongos da linhagem doadora C57BL/6 (B6) H-2^b, utilizando-se as vias oral (V.O.) e intravenosa (V. I.). Em ambos os tratamentos os animais da linhagem A receberam quatro doses de sangue em dias consecutivos. Passados sete dias da última dose, foram submetidos a alotransplantes ectópicos na orelha, com tecido cardíaco da linhagem B6. Os grupos controles foram constituídos de animais da linhagem A que receberam solução salina pelas duas vias e após o mesmo espaço de tempo submetidos, respectivamente, ao alotransplante da linhagem B6 ou ao isotransplante da linhagem A. Esses animais foram observados diariamente por um período de até cem dias, com o auxilio de uma lupa.

Como demonstrado na Tabela 1, essa análise do aspecto macroscópico dos transplantes permitiu registrar alterações similares em todos os grupos até o sétimo dia de observação, destacando-se os seguintes aspectos: no primeiro dia, o órgão implantado apresentou uma tonalidade clara provavelmente devido à pouca vascularização na região; do segundo dia até o quinto dia o tecido implantado tinha uma tonalidade mais escura onde se visualizava uma boa vascularização; a partir do quinto dia, além das características acima citadas, ocorreu o aparecimento de um alo amarelo circundando os diferentes transplantes, como resultado do processo inflamatório.

Após o sétimo dia ocorreu batimento cardíaco em todos os animais do grupo controle submetido ao isotransplante, permanecendo até o centésimo dia. Nos

experimentos com inoculação do sangue pela V.O. correu batimento em 80% dos animais por um período de cinco dias. Nos experimentos de inoculação do sangue pela V.I. apenas cerca de 10% dos animais apresentaram batimento cardíaco, persistindo até o nono dia, com observação semelhante nos animais controles submetidos ao alotransplante.

A rejeição foi controlada através da redução do tecido cardíaco implantado. Esta redução foi observada nos camundongos inoculados com sangue pela V. O. por volta do 20º dia; e nos camundongos que receberam sangue pela V. I., coincidindo com os contrôles dos alotransplantes, por volta do 15º dia (Figura 4, Tabela II).

Tabela I: Perfil das Observações Macroscópicas dos Animais Transplantados

DIAS	GRUPOS CONTROLES		GRUPOS INOCULADOS	
	ACEITAÇÃO	REJEIÇÃO	V.O.	V. I.
1	OC,PV	OC, PV	OC, PV	OC, PV
2	OE, BV	OE, BV	OE, BV	OE, BV
3	OE, BV	OE, BV	OE,BV	OE,BV
4	OE,BV	OE,BV	OE,BV	OE,BV
5	OE,BV, AA	OE, BV, AA	OE, BV, AA	OE, BV, AA
6	OE, BV, AA	OE, BV, AA	OE, BV, AA	OE, BV, AA
7	BC	OE, BV, AA	BC	OE, BV, AA
8	BC	OV, BV	BC	OV, BV
9	BC	OV, BV	BC	OV, BV
"	"	"	"	"
11	BC	OV, BV	BC	OV, BV
12	BC	OV, BV	OV, BV	OV, BV
"	"	"	"	"
15	BC	ODT	OV, BV	ODT
"	"	"	"	"
20	BC	OA	ODT	AO

OC: órgão claro **PV:** pequena vascularização **AA:** amarelo ao redor

BC: batimento cardíaco **OE:** órgão escuro **BV:** boa vascularização

OV: órgão vermelho **OA:** órgão ausente **ODT:** órgão diminuindo de tamanho

Tabela II: Viabilidade do órgão visualizado

ÍNDICE DE SOBREVIVÊNCIA DOS TRANSPLANTES			
GRUPOS EXPERIMENTAIS	SANGUE	SINGENEICO	ALOGENEICO
NORMAL	_	20/20 (100)	0/20 (15)
INOCULADOS V. O.	+		0/20 (20)
INOCULADOS V. I.	+		0/20 (15)

- Coração de camundongos C57/BL6 transplantados em camundongos A/J em diferentes grupos experimentais.
- O número entre parêntese representa o tempo de sobrevivência do tecido transplantado.

Gráfico A

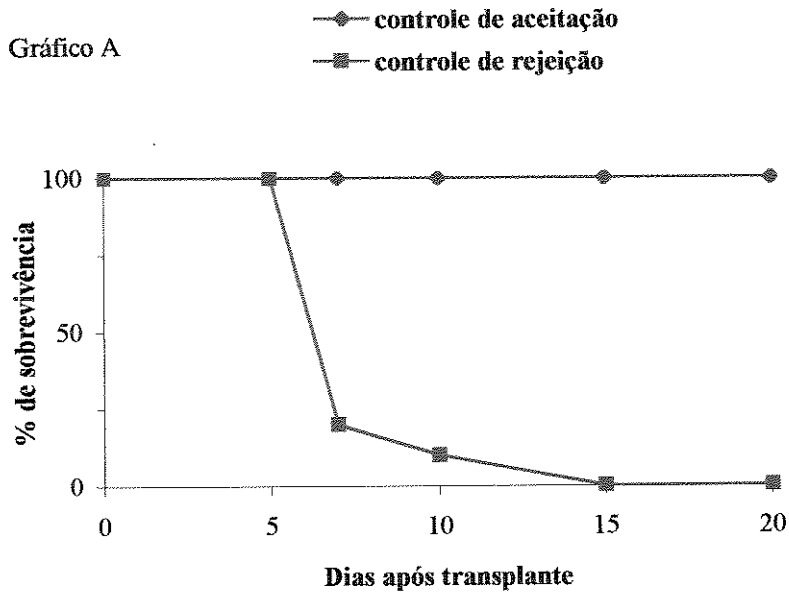


Gráfico B

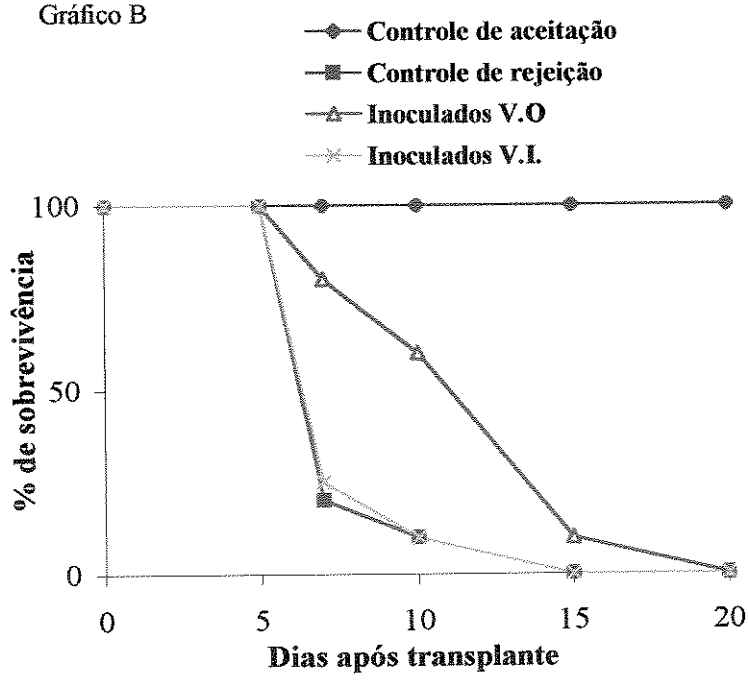


Figura 4: Avaliação macroscópica do tempo de sobrevivência do transplante. Gráfico A: controles de aceitação e rejeição. Gráfico B: avaliação dos diferentes grupos, transplantados após a administração de sangue ou salina fisiológica.

Avaliação Histológica dos Locais de Transplante

Na avaliação histopatológica realizada nesse estudo, cortes histológicos do tecido cardíaco a ser implantado, provenientes do recém-nascido de um dia (Figura 5), foram empregados como referencial para a sua identificação no local da inserção (Figura 6). Ademais, nos cortes de tecidos implantados, analisou-se o processo de vascularização, a viabilidade das fibras, a presença de necrose, e o aspecto quantitativo e qualitativo do infiltrado celular na região.

Com base nos dados da avaliação macroscópica através do acompanhamento diário dos diferentes grupos de animais, foram determinados os dias para a coleta de material, coincidindo respectivamente com os 5º, 10º, 15º e 20º dias. Como forma de comparação iniciou-se analisando os grupos controles.

No 5º dia após o transplante, a análise microscópica dos cortes histológicos derivados dos diferentes grupos (inoculados com sangue de camundongos da linhagem B6, pela V.O. e V. I., animais dos grupos controles), permitiu a observação de um infiltrado celular reduzido, com fibras cardíacas viáveis associadas às áreas de necrose (Figura 7), respaldando as imagens sugeridas macroscopicamente.

Nas observações dos cortes do 10º dia dos animais submetidos ao isotransplante (Figura 8), foi registrada a presença de fibras cardíacas viáveis na periferia, fibras necróticas no centro e ausência de infiltrado celular.

Similaridade de imagens foram observadas nos tecidos dos animais inoculados com sangue de B6 pela V.O., V. I., com os respectivos controles, que foram submetidos aos alotransplantes, visibilizando-se a presença de fibras cardíacas viáveis na periferia, fibras cardíacas necróticas no centro e um exuberante (repleto) infiltrado linfocitário (Figuras 9 e 10).

Uma imagem similar à do 10^{O} dia (Figura 8), foi observada nos cortes de tecidos dos animais submetidos ao isotransplante do 15^{O} dia (Figura 11). Na análise dos animais submetidos aos alotransplantes (controle de rejeição), observou-se um infiltrado linfocitário acentuado; a presença de fibroblastos em áreas da periferia e do centro do tecido transplantado; regiões hemorrágicas com tecido de reparação jovem (Figura12). Nos animais inoculados com sangue de B6 por V. I. o tecido implantado já se encontrava totalmente substituído, como igualmente observado nos animais do grupo controle do alotransplante (Figura 12). Quando analisou-se o grupo dos inoculados com sangue de B6 por V. O. (Figura 13), notou-se um infiltrado linfocitário de menor intensidade; e a presença de fibras cardíacas preservadas no centro.

Ao analisar-se os cortes no 20^{o} dia, observou-se no grupo controle submetido ao isotransplante (Figura 14) a mesma imagem da Figura 8, notadamente a ausência de infiltrado linfocitário bem como a presença de tecido de reparação jovem (Figura 15). Nos animais inoculados com sangue de B6 pela V. O. (Figura 16), o tecido implantado já foi totalmente substituído, mostrando a presença de infiltrado linfocitário e tecido de reparação jovem. No grupo dos inoculados com sangue V. I. observou-se, um infiltrado linfocitário intenso, a presença de fibroblastos e áreas com fibras colagenas intensas, destacados pela coloração (Figura 17).

Prancha I:

A) Aspectos histológicos do coração normal isolado de um camundongo recém-nascido, ou inserido numa orelha de camundongo adulto.

Figura 5: Corte transversal do Coração. Fibras cardíacas (miocardiócitos) dispostas em várias direções, observando-se o epicárdio à esquerda (E).HE 256X. No detalhe ampliado miocardiócitos com núcleos de localização central (seta) e citoplasma ramificado (ponta de seta)- HE 512X.

Figura 6: Corte transversal da orelha com transplante de coração. Epitélio de revestimento das faces externas da orelha (seta); e coração (C)- HE 64X.

Figura 7: Corte transversal da orelha com transplante de coração. Epitélio de revestimento da orelha (E). Estreita faixa de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório discreto (asterisco) - HE 128X. No detalhe fibras cardíacas (FC) preservadas na periferia e fibras cardíacas necróticas (FCN) - HE 512X.

5

6

7

Prancha II:

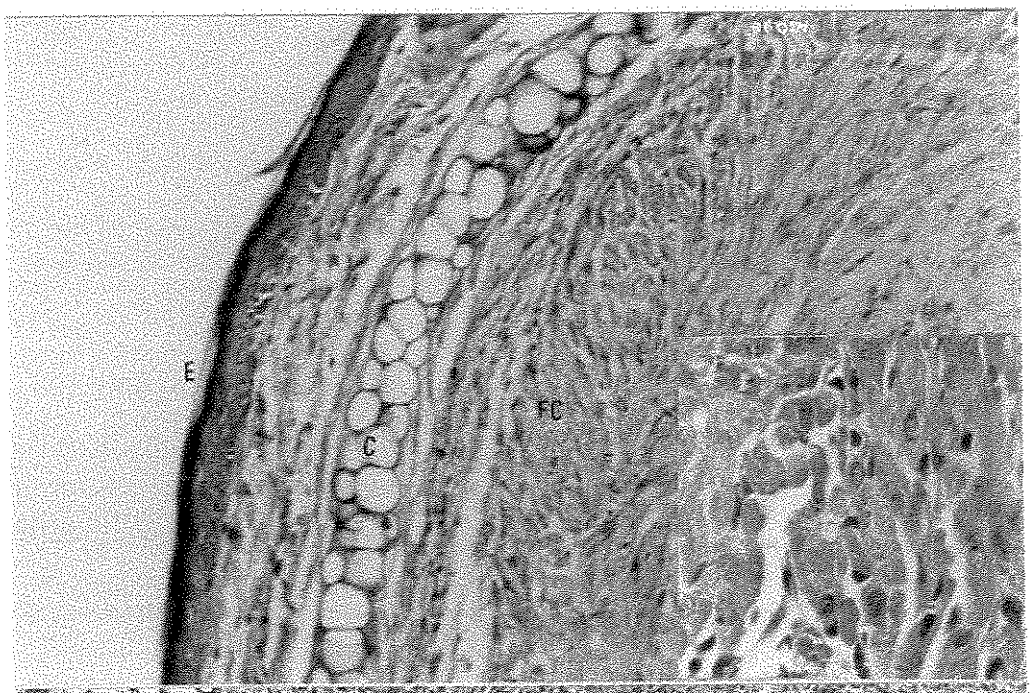
B) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 10 dias de transplante.

Figura 8: Isoenxerto - Epitélio de revestimento da orelha (E) e peça de cartilagem hialina (C). Presença de fibras cardíacas preservadas (FC) - HE 128X. No detalhe, ausência de infiltrado de células mononucleares - HE 512X.

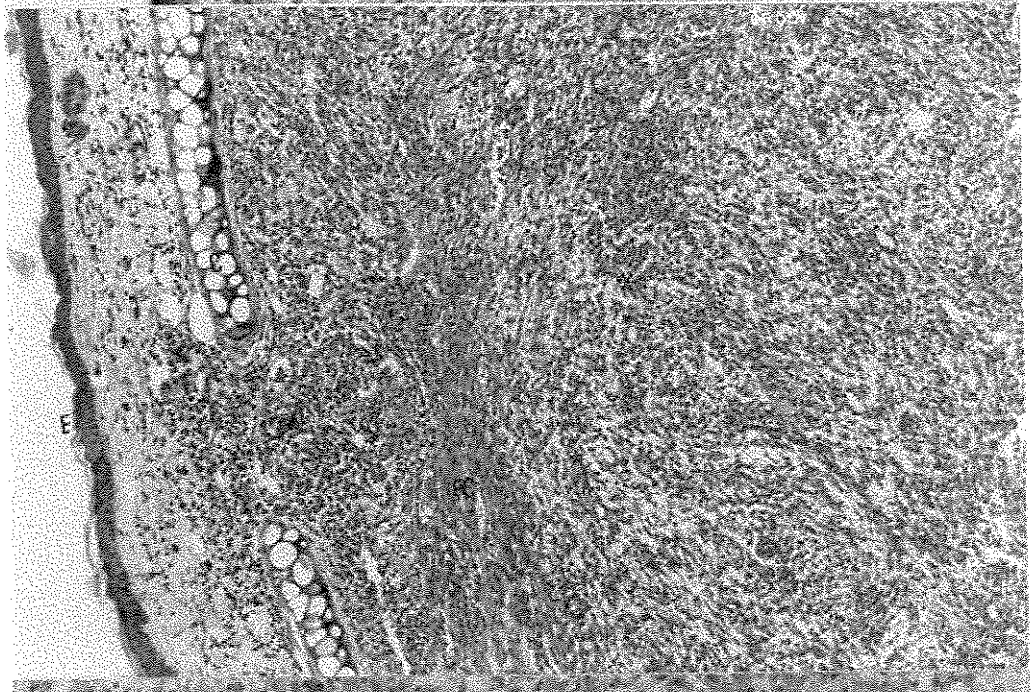
Figura 9: Aloenxerto - Epitélio de revestimento da orelha (E) e peça de cartilagem hialina (C). Presença de fibras cardíacas preservadas (FC), e denso infiltrado de células mononucleares (asterisco) - HE 128X.

Figura 10: Aloenxerto de camundongo inoculado com sangue V. O. - Denso infiltrado de células mononucleares (asterisco); capilares e venulas (V) dilatados contendo hemácias. Presença de fibras cardíacas preservadas (setas) - HE 256X.

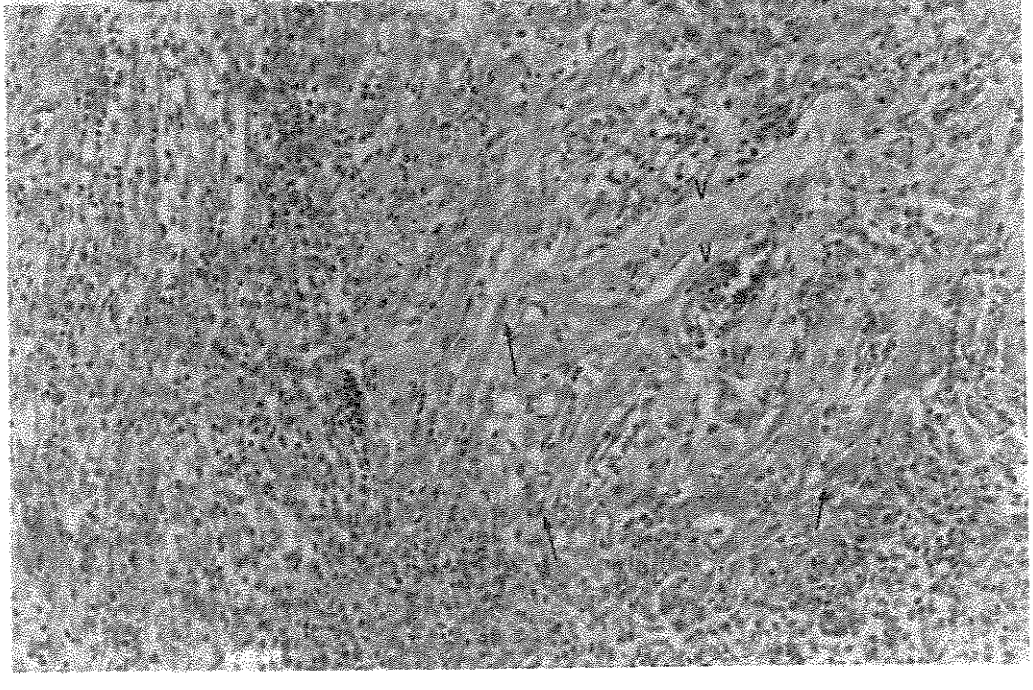
8



9



10



Prancha III:

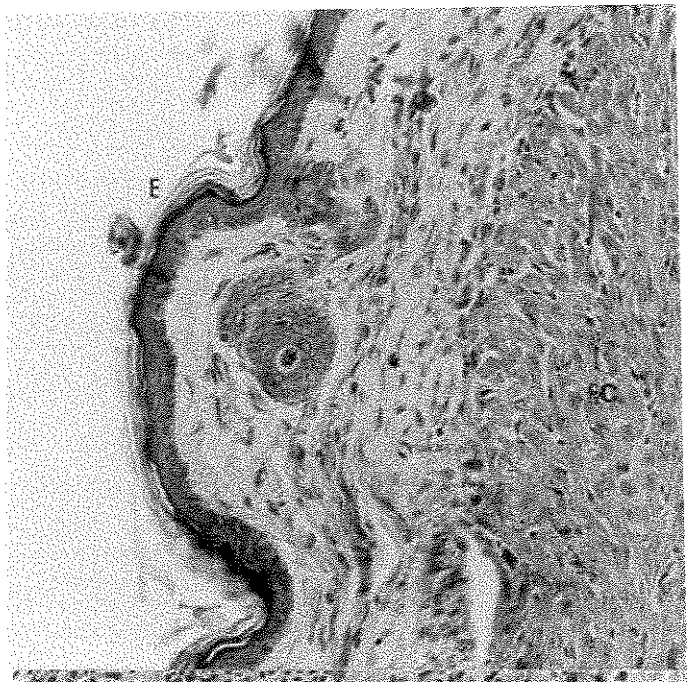
C) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 15 dias de transplante.

Figura11: Isoenxerto - Epitélio de revestimento (E). Fibras cardíacas preservadas (FC) e fibras cardíacas necróticas no centro. HE 256X.

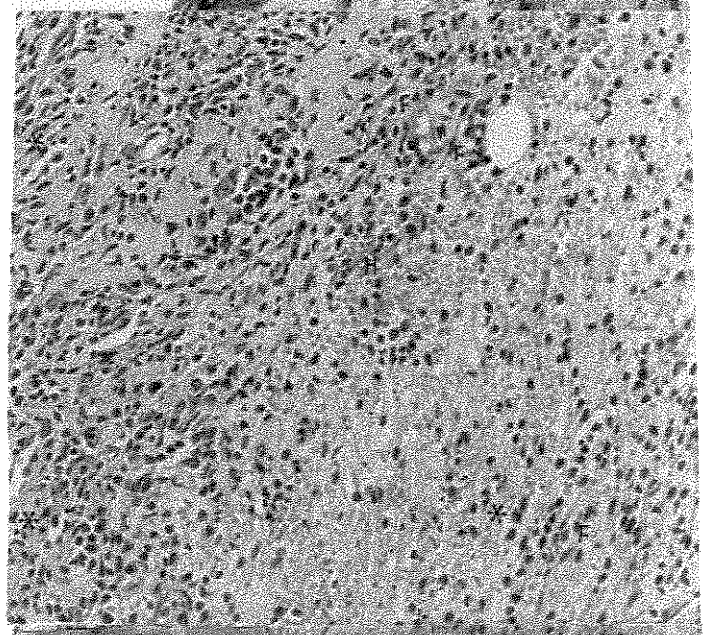
Figura 12: Aloenxerto- Denso infiltrado de células mononucleares(setas) e presença de fibroblastos (F). Áreas hemorrágicas no centro (H), tecido de reparação bastante jovem(asterisco).HE 256X

Figura 13: Aloenxerto de camundongo inoculado com sangue V. O.- Infiltrado linfomonocitário (asterisco). Fibras cardíacas preservadas (FC)- HE 256X. No destaque fibras cardíacas preservadas na área central (FC) HE 512X.

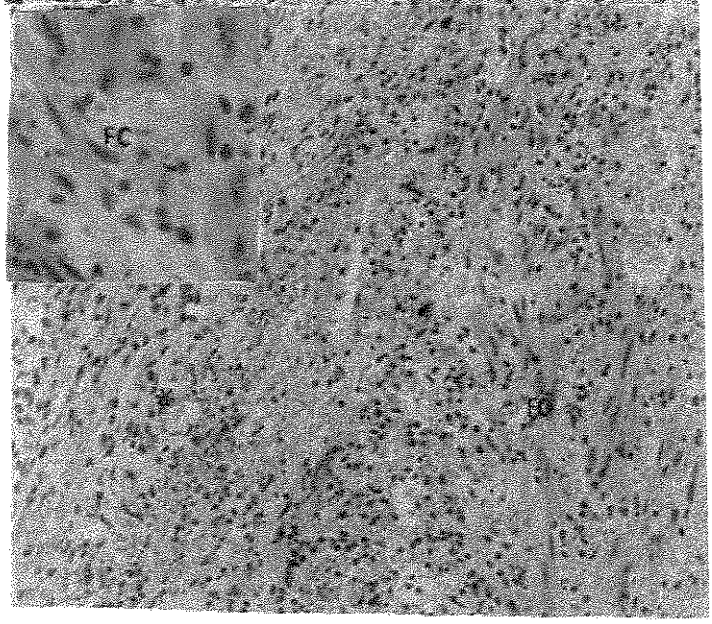
11



12



13



Prancha IV:

D) Corte transversal da orelha de camundongo adulto contendo coração de recém-nascido após 20 dias de transplante.

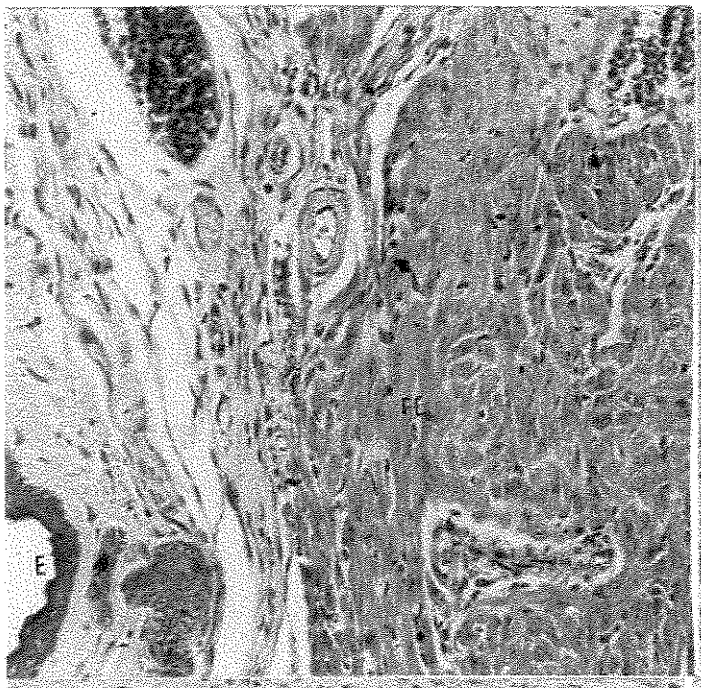
Figura 14: Isoenxerto- Epitélio de revestimento da orelha (E), as fibras cardíacas preservadas (FC). HE 256X

Figura 15: Aloenxerto- Denso infiltrado de células mononucleares (setas), tecido de reparação jovem no centro (asterisco)- HE 256X.

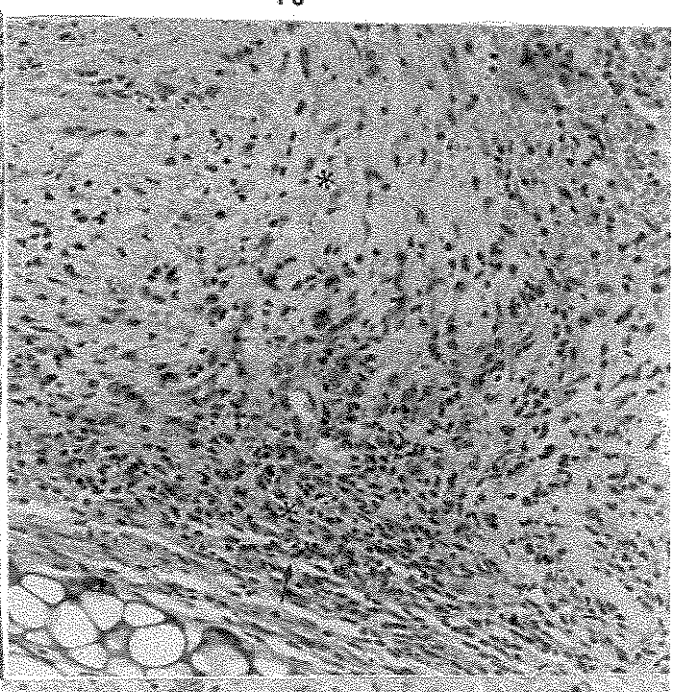
Figura 16: Aloenxerto de camundongos inoculados com sangue V.O.- Tecido de reparação jovem (asterisco). Infiltrado de células mononucleares(I)- HE 256X.

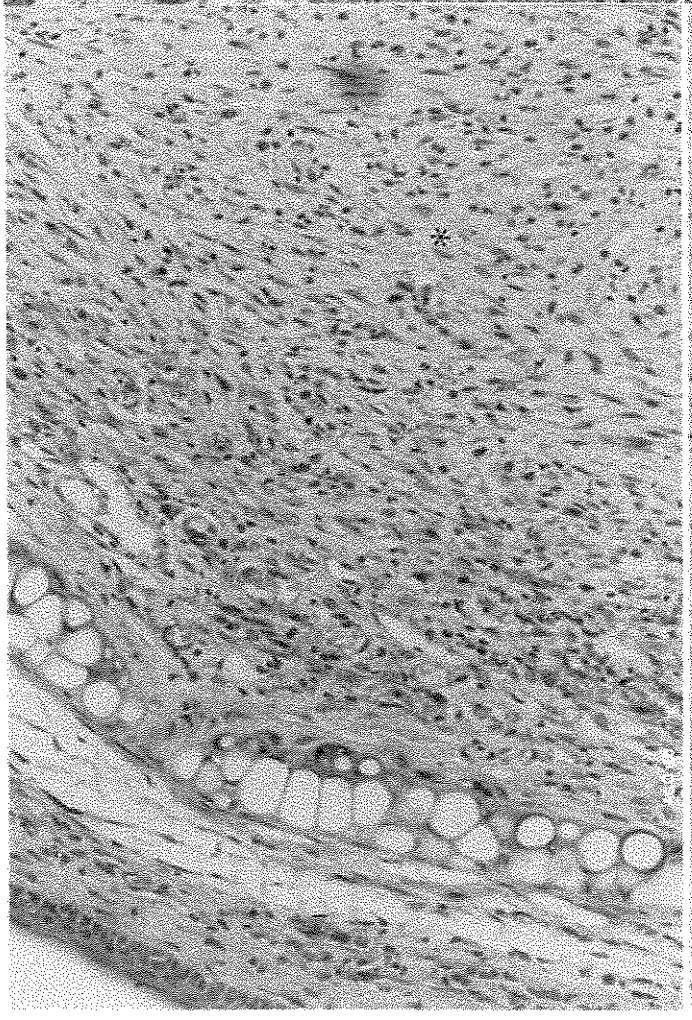
Figura 17: Aloenxerto de camundongo inoculado com sangue V. I.- Infiltrado de células mononucleares (asterisco), fibroblastos (F) e áreas com fibras colagenas espessas (A).TRIC 256X.

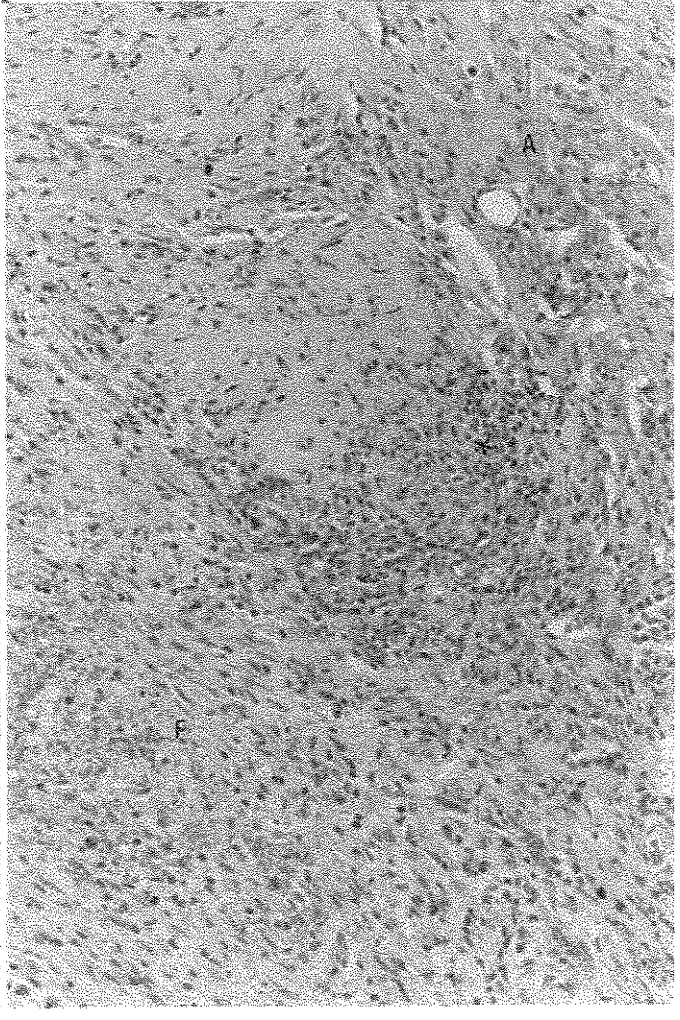
14



15







16

17

DISCUSSÃO:

No presente trabalho foi feita uma tentativa de indução de tolerância através da inoculação de sangue antecedendo um alotransplante ectópico de tecido cardíaco, usando-se camundongos como modelos experimentais.

Como demonstrado em antigos relatos da literatura, as sucessivas transfusões sangüíneas que antecediam os transplantes em pacientes renais crônicos têm beneficiavam a aceitação dos mesmos (MARQUET *et al.* 1971, OPELZ *et al.* 1973, BLUMBERG *et al.* 1995).

Buscando-se estabelecer qual a melhor via para a inoculação do sangue, camundongos machos da linhagem A/J, usados como receptores, foram inoculados pelas vias oral e intravenosa com sangue camundongos machos da linhagem C57BL/6, e submetidos após uma semana, a um alotransplante ectópico de tecido cardíaco. Além da escolha da via intravenosa convencional, experimentou-se a via oral levando-se em conta os conhecimentos sobre a indução de tolerância por essa via, especialmente associada ao processo natural da digestão alimentar, ou induzida experimentalmente com diversos objetivos, através da administração oral de diferentes concentrações de proteínas (VAZ, 1981; GARSIDE et al, 1995; CONDE et al 1998).

A indução de tolerância oral tem sido experimentada no controle de doenças autoimunes, como nos casos da autoimunidade ocular ou da encefalomielite.
A administração oral do antígenos como terapêutica apropriada para uveites, foi feita primeiramente por NUSSENBLAT *et al.*, (1990). RIZZO, (1995), tendo demonstrado que a tolerância oral para uveites podia ser induzida com antígenos oculares e seus peptideos. No caso da encefalomielite, trata-se da doença autoimune mais estudada experimentalmente, através da inoculação oral de proteína básica de mielina, tendo-se alcançado a geração de tolerância em ratos e/ou camundongos susceptíveis a

desenvolver a doença. A indução de tolerância oral com proteína básica de mielina (MBP) em animais transgenicos para MBP, alem de proteger os animais da doença, demonstrou que na utilização de doses altas ou baixas de MBP, havia uma estimulação para a liberação de TGFβ, IL4, IL10, indicando uma atividade imunológica de predominância do circuito Th2 (CHEN et al. 1996).

As sugestões de CARR *et al.*, (1995), também foram consideradas na escolha da via oral para a indução de tolerância pela administração do sangue. Esses autores demonstraram uma redução significativa da rejeição, quando estudaram o efeito da administração de células esplênicas pelas vias oral ou diretamente na veia porta do fígado, antecedendo um alotransplante de rim em ratos.

No modelo experimental em deste trabalho foram utilizados apenas animais do sexo masculino, com o objetivo de se evitar a interferência do ciclo estral das fêmeas. Optou-se pela linhagem A/J como receptora, pelo conhecimento de apresentarem haplótipo diferenciado da linhagem doadora B6, e dos animais serem dóceis quando mantidos agrupados.

A escolha do número de doses do sangue a ser administrado, bem como o intervalo entre estas e a realização dos transplantes constituíram parâmetros de estudo baseados em diferentes citações. GORCZYNSKI *et al.*, (1986), em protocolo de transplantes de pele, inocularam por via intravenosa em camundongos da linhagem A sete dias antes do alotransplante, três doses de 0,25ml de sangue de camundongos das linhagens C57BL/6 ou BALB/c, e associou por via intraperitonial a injeção de soro anti-linfocitário (ALS). CUTURI *et al.*, (1994) realizaram transfusões sangüíneas 7 e 14 dias antes dos transplantes cardíacos ectópicos na região abdominal em ratos. TCHEVENKOV *et al.*, (1995), em experimentos com ratos, realizaram transfusões sangüíneas 24hs antes do transplante ectópico e nos dias 7, 14 e 21 pós-transplante,

associadas com a administração de ciclosporina e anticorpo monoclonal anti-células T, o que permitiu inclusive uma sobrevivência do alotransplante por tempo indefinido.

DZIK *et al.*, (1996) revisando o assunto enfatizaram os resultados animadores da associação de transfusões sangüíneas com a utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4 e de drogas imunossupressoras, que resultaram numa sobrevivência mais prolongada do transplante. Entre os modelos experimentais citados, demonstraram que as linhagens de camundongos C57BL/6 ($H\text{-}2^b$) e BALB/c ($H\text{-}2^d$) têm sido as mais empregadas.

Experimentalmente, as transfusões sangüíneas V.I. em camundongos das linhagens C3H/He ($H\text{-}2^k$) e C57BL/10 ($H\text{-}2^b$) associados a anticorpos monoclonais anti-CD4 antes dos transplantes, têm prolongado o tempo de sobrevivência dos mesmos (SAITOVITCH, *et al.* 1996). MIYANARI *et al.*, (1997), demonstraram em ratos, que uma simples injeção intravenosa de sangue fresco heparinizado sete dias antes de um alotransplante de fígado, prolongava a sua sobrevivência.

Em nossos experimentos, embora não se tenha realizado uma transfusão clássica, nas inoculações feitas pelas duas vias trabalhou-se com uma mistura de sangue de vários indivíduos da linhagem doadora, obtido com o anticoagulante citrato de sódio, originário de bolsas para a coleta de sangue humano. Em vista da importância representada pela administração de sangue heterólogo, a escolha desse anticoagulante entre diferentes opções, foi realizada com o suporte de informações sobre suas propriedades químicas e biológicas e principalmente pelos possíveis efeitos colaterais (COELHO, 1964). A heparina por exemplo, é uma substância oriunda do fígado usada na medicina como anticoagulante por mais de 50 anos. Estudos têm mostrado que além dos efeitos anticoagulantes, esta tem efeitos imunomoduladores em baixas dose, ou pode-se ligar à proteínas da coagulação sangüínea; à fibronectina; à componentes do

sistema complemento ou à fatores de crescimento; ou exercer um efeito imunosupressor (GÓRSIKI *et al.* 1991). Dai a não utilização da heparina como anticoagulante, optando-se pelo citrato de sódio que é em geral considerado de baixa inocuidade.

Revisando a prática de transfusões sangüíneas associadas aos transplantes de rim, coração, pâncreas e pele, BEKTAS *et al.*, (1997) destacaram que o efeito benéfico da transfusão é dependente do tipo de órgão transplantado bem como da incompatibilidade genética envolvida, e que a quantidade de sangue administrada também determina o tipo de reação imunológica observada. O autor relata a utilização de sangue na dose de 1 ml para ratos de 200 a 250 gramas de peso corpóreo, ao que eqüivale a 500 ml de sangue total em uma pessoa de 70 quilos.

No presente trabalho também buscou-se uma proporcionalidade para a administração do sangue compatível com o peso corpóreo dos camundongos. Um volume de sangue representando 5 % do peso corpóreo foi administrado pela via intravenosa, e um volume 5 vezes maior pela via oral. Os animais dos grupos controles, foram inoculados com solução salina fisiológica pelas vias intravenosa e oral, com as mesmas doses, na mesma freqüência e durante o mesmo período de tempo, em condições similares de estresse.

Nos transplantes ectópicos realizados segundo FULMER *et al.*, (1963) e modificado por RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*,(1992), o tecido cardíaco (ventrículo) foi retirado de camundongos recém-nascidos de um dia, e implantados na orelha de um adulto. Esta prática apresenta simplicidade de manipulação e de acompanhamento macroscópico, sendo visível inclusive os batimentos cardíacos. A utilização de tecido cardíaco proveniente de camundongos com dois dias de nascido não apresentam o mesmo resultado.

Existe entretanto outras modalidades de transplantes cardíacos ectópicos,

como por ex.: introdução do órgão na capsula supra renal ou na cavidade peritonial ligando-se o órgão através das veias e artérias abdominais, onde a verificação do batimento cardíaco pode ser observada apenas por palpação (GOSS *et al.* 1993, TCHEVENKOV *et al.* 1995 e SCHULZ *et al.* 1995).

Nos relatos de HEDRICH, (1990) que realizou transplantes de pele em ratos e camundongos isogênicos, está descrito que nos sete primeiros dias o aspecto inflamatório dos alotransplantes são idênticos aos dos isotransplantes. Como demonstrado em nossos resultados (Tabela I e Figura 4), também não foram observadas diferenças nos isotransplantes e alotransplantes ectópicos de tecido cardíaco após os sete primeiros dias. HEDRICH, (1990) também afirmou que a sobrevivência do transplante por mais de cem dias de uma linhagem isogênica em um isotransplante resulta numa prova de estabilidade genética, não havendo assim a ocorrência de mutação na linhagem utilizada. Essa referência respalda o resultado deste trabalho quanto à isogenia da linhagem A/J usada como receptora, na qual os isotransplantes foram observados por um período de até cem dias.

Embora de difícil registro, o acompanhamento sistemático dos aspectos macroscópicos dos diferentes grupos de animais transplantados foi realizado através de sinais visíveis na reação inflamatória local (edema, coloração do tecido, vascularização etc.), e do monitoramento dos "batimentos" cardíacos, visualizado pela contractilidade do tecido cardíaco transplantado. Assim foi possível distinguir entre o quadro inflamatório de uma aceitação e de uma rejeição dos transplantes: no caso da rejeição observou-se a parada do batimento cardíaco três dias após, diminuição do tecido implantado e perda da vascularização; enquanto que na aceitação foi observado batimento cardíaco por mais de cem dias, sem outras alterações.

Segundo FULMER *et al.*, (1963), a presença de batimento cardíaco pode

ser uma demonstração de aceitação, mas nesse tipo de transplante ectópico, a não ocorrência de batimento não significa rejeição pois nos seus resultados, apenas 60% dos transplantes efetuados dessa forma apresentaram batimento. Destaque-se a importância da realização de escoriações na região a ser introduzido o tecido cardíaco (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*1992), com a finalidade de acelerar a vascularização do tecido implantado.

Nos dados apresentados por GORCZYNSKI *et al.*, (1986), que usaram como doadores camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 e a linhagem A/J como receptora, o tempo de rejeição dos transplantes de pele do grupo controle entre C57Bl/6 e A/J foi de 15 dias. Embora o processo de vascularização seja diferente no transplante ectópico, nos resultados da Figura 4–A observou-se o mesmo tempo de rejeição, sendo justificado pela incompatibilidade genética desses animais. Quando foi utilizada a linhagem BALB/c como doadora o tempo de rejeição ficou mais prolongado, por diferirem menos geneticamente. Em outro modelo experimental no qual se estudou a associação de uma infecção por *Tripanossoma cruzi* e tratamento com anti- $CD4^+$, n o transplante ectópico de tecido cardíacó na orelha, entre as linhagens C57BL/6 como doadora e BALB/c como receptora, o tempo de rejeição no grupo controle foi de 20 dias (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.* 1992).

Os resultados da Figura 4-B demonstram leves alterações que refletem um retardo na rejeição dos transplantes especialmente nos animais que receberam sangue pela V.O., quando comparados aos que receberam pela V. I. Embora os aspectos macroscópicos fossem muito parecidos com aqueles observados no controle de rejeição, apenas 10% dos animais que receberam sangue pela V.I. apresentaram batimentos por um tempo de três dias. Em contrapartida, 80% dos animais que receberam sangue V.O. apresentaram batimento cardíaco por um período de 5 dias.

A análise histopatológica dos diferentes transplantes foi realizada, a partir das imagens microscópicas observadas nos diferentes cortes de tecidos, na comparação entre o tecido cardíaco antes e após ser implantado na orelha e na evolução do processo inflamatório associado com os diferentes dias de observação.

Com a análise dos cortes nos dias 5, 10, 15 e 20 verificou-se que o processo de rejeição iniciou-se entre o 5° e 10° dia: no 5° dia a imagem observada foi a mesma para todos os grupos, com infiltrado inflamatório discreto, fibras cardíacas preservadas na periferia e necróticas na área central do transplante com vasos dilatados. No 10° dia nos animais controles de rejeição e naqueles que receberam sangue pelas V.O. e V.I., estavam presentes algumas fibras cardíacas preservadas na periferia, um denso infiltrado de células mononucleares, além de capilares e vênulas (Figura 9 e 10). Entretanto para o grupo controle de aceitação foi observada a presença de fibras cardíacas preservadas e ausência de infiltração de células mononucleares, constatando uma aceitação do transplante (Figura 8). Essa imagem do grupo controle de aceitação foi preservada nas análises dos 15º e 20º dias (Figuras 11 e 14).

No transplante do tecido cardíaco na orelha, a irrigação sangüínea do tecido ocorre espontaneamente por anastomose e formação de novos vasos no tecido implantado. Uma circulação completa do tecido transplantado parece ter ocorrido após o quinto dia, porquanto foi observada a mesma imagem para todos os grupos, representada na figura 7. Devido a irrigação tardia, encontramos áreas de necrose na região central até no grupo controle de aceitação. O que não ocorre quando a irrigação é direta, como no trabalho de GOSS *et al.*, (1993).

Confirmando as observações macroscópicas dos grupos inoculados com sangue, onde os animais inoculados pela via oral apresentavam 80 % de batimentos cardíacos durante 5 dias, a presença de fibras cardíacas viáveis foi demonstrada na Figura

15 até o 15º dia. Os animais do controle de rejeição ou inoculados com sangue pela V.I. apresentaram um denso infiltrado de células mononucleares na periferia e áreas de substituição do tecido cardíaco por fibroblastos (Figura 12). O infiltrado linfomonocitário nos inoculados com sangue pela V.O. apresentou-se com menor intensidade (figura 13), quando comparados com a figura anterior, além da presença de fibras cardíacas viáveis na região central, sugerindo um retardo no processo de rejeição.

A rejeição em um transplante cardíaco dos animais controles comprovada por SCHULZ *et al.*, (1995), mostraram que o parênquima cardíaco estava com um infiltrado de células, incluindo linfócitos, linfoblastos e macrófagos, com sinais de destruição de miócitos. Nos resultados de RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, (1992), verificaram um infiltrado linfomononuclear difuso com fibrose intersticial (que é a substituição do tecido cardíaco por fibroblastos e tecido conjuntivo).

No vigésimo dia, o denso infiltrado e o tecido de reparação se mantiveram iguais ao do 15º dia (Figura 15). Animais inoculados com sangue pela V.O. (Figura 16), quando comparados aos do 15º dia (Figura 13), não havia fibras cardíacas viáveis e o infiltrado já se apresentava mais denso como o da Figura 15. Nos animais que foram inoculados com sangue pela V.I. (Figura 17), o tecido conjuntivo de reparação encontra-se em uma fase mais adiantada de maturação do que das figuras 15 e 16 (controle de rejeição e via oral), sugerindo uma aceleração do processo de rejeição neste grupo.

Tem-se estudado o efeito isolado da aplicação de anticorpos monoclonais antecedendo a transplantes, como RIBEIRO DOS SANTOS *et al.* 1992, que inocularam anti-$CD4^+$ com o intuito de induzirem tolerância em animais infectados com chagas, para que esses animais pudessem receber um transplante. BIERER *et al.* 1993, testaram os imunossupressores CSA e FK506 e verificaram que inibem o sinal de transdução das

células T, sem inibir os receptores de ativação das linfocinas.

Modelo experimental com ratos transfundidos com sangue de doador específico tiveram retardo da rejeição, mas rejeitaram hiperagudamente quando inoculados com linfócitos do mesmo doador por via intravenosa (JASKLOWS *et al.* 1996). Enfim, são inúmeras as propostas para a indução de tolerância para a administração do sangue com reagentes imunobiológicos ou com imunossupressores.

No entanto persiste a idéia de se buscar um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nessa tolerância, especialmente pelas informações já consagradas da necessidade da presença das células linfocitárias e dos seus produtos de secreção (TIZARD, 1995). A análise global dos resultados aqui apresentados, inferem sobre a existência de uma somatória de mecanismos imunológicos, abrindo perspectivas de estudo para inúmeros parâmetros.

CONCLUSÕES:

- Um modelo experimental de alotransplantes ectópicos de tecido cardíaco na orelha, foi desenvolvido em camundongos de duas linhagens isogênicas com haplótipos distintos A/J (H-$2^{a)}$ e C57BL/6 (H-2^{b}) destacando-se a importância do controle de qualidade sanitária e do monitoramento genético desses animais:

- Nos isotransplantes entre camundongos da linhagem A/J de haplótipo H-2^{a}, a sobrevivência foi por mais de 100 dias, comprovando-se a isogenia desta linhagem. - Nos alotransplantes entre camundongos de haplótipos diferentes A/J (H-$2^{a)}$ e C57BL/6 (H-2^{b}), uma típica rejeição ocorreu em 15 dias, confirmando a heterogeneidade entre as duas linhagens.

- Na tentativa de indução de tolerância aos alotransplantes através da inoculação prévia de sangue do doador C57BL/6 (H-2^{b}) para o receptor A/J (H-2^{a}) pelas vias intravenosa e oral, nos alotransplantes dos camundongos inoculados com sangue por via intravenosa a sobrevivência do tecido cardíaco foi de 15 dias; e dos camundongos inoculados com sangue pela via oral a sobrevivência do tecido cardíaco foi de 20 dias sugerindo que a via oral é mais eficiente na manutenção do transplante.

- A análise histológica conjunta desses dados destacou o infiltrado de células mononucleares e a presença ou não de fibras cardíacas viáveis como sinalizadores determinantes para a permanência ou rejeição do transplante. Nos tecidos do 15° dia, de camundongos inoculados com sangue pela via oral foi demonstrada a presença de fibras cardíacas viáveis, compatível com o retardo no processo de rejeição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, R. N. & ELSON, C. J. Multipe self epitopes on the Rhesus poly peptides stimulate immunologically ignorant human T cells in vitro. *Eur. J. Immunol* 24: 1578-1582, 1994.

BECAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. (1° ed.) Ed. Livros Técnicos e Científicos S. A.., 2 volumes,1976.

BEKTAS, H.; JÖRNS, A.; KLEMPNUER, J. Diferential effect of donor-specifc blood transfusions after kidney, heart, pancreas, and skin transplantation in major histocompatibility complex incompatible rats. *Transfusion (Bethesda)* 37 (2): 226-230, 1997.

BIERER, B. E.; HOLLÄNDER, G.; FRUMAN, D. & BURAKOFF, S. J. Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr. Op. Immunol.* 5: 763-773, 1993.

BLUMBERG, N. & HEAL, J. M. Transfusion and the imune system: a paradigm shift In progress? *Transfusion* 35: 879-883, 1995.

BUMGARDNER, G. L.; CHEN, S.; ALMOND, P. S.; BACH, F. H.; ASCHER, N. L.; MATAS, A. J. Cell subsets responding topurifiede hepatocytes and evidence of indirect recognition of hetocyte major histocompatibility complex class I antigen. I The role of L3T4+T cells in the development of allospespecific cytotoxicity in

hepatocyte sponge matrix allografts. *Transplantation,* 53 (4) 857-862, 1992.

CARR, R. I.; ZHOU, J.; LEDINGHAM, D.; MALONEY, C.; McALISTER, V.; SAMSON, M.; BITTER-SUERMANN, H. & LEE, T. D. G. Induction of transplantation tolerance by Feeding or Portal vein injection pretreatment of recipient with donor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 368:370, 1995.

CHEN,Y.; INOBE, J.-I.; KUCHROO, J.; BARON, J. L.; JANEWAY, C. A. Jr. & WEINER, H. L. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice. Suppression of autoimmune encephalo myelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 388-391, 1996.

COELHO, L. L. Técnicas de Lab. Clínico, Livraria Atheneu 2ª ed 38-39.

CONDE, A. A.; STRANSKY, B.; FARIA, A. M. C. & VAZ, N.M. Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. *Braz. J. Med. Biol.Res.* 31(3): 377-380, 1998.

CORDELIER, IgL. Immunologie. Vol. II, cap. 6, 1984

CUTURI, M. C.; JOSIEN, R.; CAUTAROVICH, D.; BUGEON, L.; ANEGON, I.; MENORET, S.; SMIT, H.; DOUILLARD, P. & SOULLILLON, J. -P. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response In allograft tolerance In adult rats. *Eur. J. Immunol.* 24: 1627-1631, 1994.

DAKIN, R. Remarks on a cutaneous affection, produced by certain poisonous vegetables. *Am. J. Med. Sci.* 4: 98-100, 1829.

DZIK, S.; BLAJCHMAN, M. A.; BLUNBERG, N.; KIRKLEY, S. A.; HEAL, J. M.; WOOD K. Current Research on the Immunomodulatory Effect of Allogeneic Blood Transfusion. *Vox Sang.* 70: 187-194, 1996.

FISCHEL, R. J.; ASCHER, N. L.; PAYNE, W. D. *et al.* Pediatric liver transplantation across ABO blood group barriers. *Transplant Proc.* 21(1): 2221-2222, 1989.

FULMER, R. I.; CRAMER, A. T.; LIEBELT, R. A. & LIEBELT, A. G. Transplantation of cardiac tissue into the mouse ear. *Am. J.of Anat.*. 113: 273-281, 1963.

GARSIDE, P.; STEEL, M.; WORTHEY, E. A.; SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J.; BLUETHMANN, H.; LIEW, F.Y. & MOWAT, A. Mcl. T Helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *The Am.Ass. of Immunol.* 5649-5655, 1995.

GORCZYNSKI, R. M.; ROBILLARD, M. Anomalous prolonged allograft survival after deliberate immunization against graft-specific alloantigens. IN: *Parad. Immunol.* Cap. 7: 81-92, 1986.

GÓRSKI, A.; WASIK, M.; NOWACZYK, M. & KORCZAK-KOWALSKA, G. Immunomodulating, activity of heparin. *FASEB J.* 5:2287-2291, 1991.

GOSS, J. A.; NAKAFUSA,Y.; YU, S. & FLYE, M. W. Intrathymic injection of donor alloantigens induces specific tolerance to cardiac allografts. *Transplantation.* 56(1): 166-173, 1993.

HEDRICH, H. J. Principles of skin grafting. Genetic monitoring of inbred strains of rats. *Ed. by Hans J. Hedrich; Gustav Fisher Verlag- Stuttgart, New York,* 102-114, 1990.

HORI, S.; HAVAUX, X.; RUBAY, R.; LATINNE, D.; BAZIN, H. & GIANELLO, P. Effect of graft preservation and IgM depletion on guinea pig to rat cardiac xenograft survival. *Transplantation.* 63(11): 1554-1561, 1997.

JANEWAY, C. A. JR.; TRAVES, P. Imunobiologia o sistema imunológico na saúde e na doença. *Art. Méd.* 2ª ed. 1997.

JASKLOWSKA, E.M.; OLSZEWSKI, W. L.; MAKSYMOWICZ, M.; ZIOLKOWSKA, A. Mechanism of split tolerance after donor-specific transfusion. *Central- Eur. J. Immunol.* 21 (4) 229-306, 1996.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. *Livraria Editora Santos. 1°ed.* 1993.

KOKA, P.; CHIA, D.; TERASAKI, P.I.; CHAN, H.; CHIA, J.; OZAWA, M.; & LIM, E. The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival.

Transplantation. 56: 207-211, 1993.

LAFFERTY, K. J.; PROWSE, S. J. & SIMEONOVIC, C. J. Immulobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 143-173, 1983.

LASEK, W.; JAKÓBISIAK, M.; PLODZISEWSKA, M.; SZCZYTNICKI, W.; & GÓRECKI, D. The role of drug timing and histoincompatibility barrier In prolongation of cardiac graft survival In mice treated with donor-specific blood and cyclophosphamide. *Immunol. Lett.* 17 (4): 357-360, 1988.

LAZAROVITS, A. I.; ROCHON, J.; BANKS, L.; HOLLOMBY, D. J.; MUIRHEAD, N.; JEVNIKAR, A. M.; WHITE, M. J.; AMLOT, P.L.; BEAUREGARD-ZOLLINGER, L. & STILLER, C. R. Human Mouse chimeric CD7 Monoclonal antibody SDZCHH380 for the Prophylaxis of kidney transplant rejection. *J. Immunol.* 150(11): 5163-5174, 1993.

LEGRAND, DECARILE. La transfusion sanguine: histoire et pratique quotidienne. *Flash Inf* (1): 15-8, 1988.

LIEBERMAN, M.D.; SHOU, J.; SIGAL, R.K.; YU, J.; GOLDFINE, J.; DALY, J. M. Transfusion induced immunosupression results In diminished host survival In a murine neuroblastoma model. *J. Surg Res* 48 (5): 498-503, 1990.

LIN, Y.; PROUD, G.; TAYLOR, R. M. R. & KIRBY, J. A. Renal allograft rejection

protection of renal epithelium from natural killer cells by cytokine-induced up regulation of classI major histocompatibility antigens. *Immunology.* 79: 290-297, 1993.

LUDWIN, D.; SINGAL, D. P. Effect of blood transfusions from different H-1 donors on immune responses In mice. *Transplantation.* 45 (4): 77-83, 1988.

MARQUET, R. L.; HEYSTEK, G. A.; TINBERGEN, W.J. Specific inhibition of organ allograft rejection by donor blood. *Tranplant Proc.* 3: 708-710, 1971.

MIYANARI, N.; YAMAGUCHI, Y.; MATSUNO, K.; TOMINAGA, A.; GOTO, M.; ICHIGUCHI, O.; MORI, K.; OGAWA, M. Persistent infiltration of CD45RC-CD4+ Tcells, Th2- like effector cells, in prolonging hepatic allografts in rats pretreated with a donor-specific blood transfusion. *Hepatology* 25 (4): 1008-1013, 1997.

MÖLLER, E.; CARLSSON, B. & WALLIN, J. Implication of Structural Class II Gene Polymorphism for the Concept of Serologic Specificities. *Immunol. Rev.* (85): 107-128, 1985.

NEUBERGER, J.; & ADAMS, D. Immunology of liver transplantation. Editora Edward Arnold 1ª ed.: 250-251,1993.

NUSSENBLATT, R. B.; CASPI, R. R.; MAHDI, R.; CHAN, C. C.; ROBERGE, F.; LIDER, O. & WEINER, H. L. Inhibition of S-antigen induced experimental

autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J. of Immunol.* 144: 1689-1695, 1990.

OPELZ, G.; SENGAR, D. P. S.; MICKEY, M. R.; *et al.* Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc.* 4:253,1973.

RAMSEY, G.; NUSBACHER, J.; STARZL, T. E.; LINDSAY, G. D. Isohemagglutinins of graft origin after ABO-unmatched liver transplantation. *N. Eng. J. Med.* 311: 1167-1170, 1984.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SILVA, J. S.; SAVINO, W. & MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and restablishes long-term tolerance to syngeneic newborn herts grafted In mice chronically infected with ***Trypanosoma cruzi.*** *J. Exp. Med.*. 175: 29-39, 1992.

RIZZO, L. V. The use of oral tolerance as a therapy for ocular autoimmunity. *Braz. J. of Med. And Bio. Res.* 28: 931-936, 1995.

SAITOVITCH, D.; BUSHELL, A.; MABBS, D.W.; MORRIS, P. J.; WOOD, K. J. Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation. *Transplantation (Baltimore)* 61 (11): 1642-1647, 1996.

SCHULZ, M.; SCHUURMAN, H.-J.; JOERGENSEN, J.; *et al.* Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*. 25: 474-480,

1995.

SHIRWAN, H.; CHI, D.; MAKOWKA, L. & CRAMER, D. V. Lynphocytes Infiltrating rat cardiac allografts express a limited repertoire of T cell receptor Vβ genes. *J. Immunol.* 151(10): 5228-5238, 1993.

SILVERSTEIN, A. M. A History of Immunology. *Academic Press, INC.* 1ª ed. Cap 11, 1989.

SPEES, E. K.; *et al.* The effects of blood transfusion on individuals receiving their first transplant from a dead donor. *Transplant. Proc.* 13: 155, 1981.

STARZL, T. E.; MARCHIORO, T. L.; HOLMES, J. H.; *et al.* Renal homografts in patients with major donor-recipient blood group incompatibilities. *Surgery.* 55:195-200, 1964.

TANAKA, K.; KOGA, Y.; ZHANG, X.-Y.; SASAKI, M.; WANG, Y.; KIMURA, G. & NOMOTO K. Extensive apoptosis occurring in the thymus during accelerated rejection of cardiac allografts in presensitized rats. *J. Immunol.* 151(2): 748-758, 1993.

TCHERVENKOV, J. I.; COFER, B.R.; DAVIES, C. & ALEXANDER, J. W. Indefinite allograft survival induced by the combination of multiple donor-specific transfusions, cyclosporine, and an anti-T cell monoclonal antibody in a protocol relevant to cadaveric organ transplantation. *Transplatation,* 59: 821-824, 1995.

TERASAKI, P. I.. Beneficial effect of transfusion on kidney transplants. *Vox Sang.* 57 (2): 158-160, 1989.

TIZARD, I. R.; Immunology An Introduction. *Editora Saunders College Publishing.* Fourth edition: 1-517, 1995.

WICK, M. R. Blood transfusion. An historic and current prespective. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 (4 suppl 1) S2-6, 1989.

WOOD, M. L.; GOTTSCHAK, R.; MONACO, A. P. Effect of blood transfusion on IL-2 production. *Tranplantation.* 45 (5): 930-935, 1988.

VAZ, N. M. A face oculta da memória imunológica. *Ciência e Cultura.* 33 (11): 1444-1447, 1981.

VAZ, N. M.; DE FARIA, A. M. C. Guia Incompleto de Imunobiologia. *Coopmed Editora.* 1° edição, 1993.