

PAOLO ROGÉRIO DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**NOVOS CONCEITOS DO MECANISMO DE AÇÃO DO
ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB NO TRANSPLANTE
DE ILHOTAS DE LANGERHANS EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Alexandre Coutinho Teixeira
de Freitas

Coordenador: Antonio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2002

PAOLO ROGÉRIO DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**NOVOS CONCEITOS DO MECANISMO DE AÇÃO DO
ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB NO TRANSPLANTE
DE ILHOTAS DE LANGERHANS EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Alexandre Coutinho Teixeira
de Freitas

Coordenador: Antonio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2002

Salvalaggio, Paolo Rogério de Oliveira

Novos conceitos do mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB no transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos - Curitiba, 2002.

110 f.

Tese (Doutorado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

1- Tolerância imunológica, 2- Anti-CD45RB, CD45RB, CTLA-4 , 3- Transplante de ilhotas de Langerhans



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**

Aluno: PAULO ROGÉRIO DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**Título da Tese: "PAPEL DA EXPOSIÇÃO AO ALOANTÍGENO NO
AUMENTO DA SOBREVIVÊNCIA DO TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE
LANGEHANS MEDIADO PELO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-
CD45RB"**

CONCEITOS EMITIDOS:

<i>Prof. Dr. Miguel Carlos Riella</i>	- Conceito emitido	<i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
<i>Prof.^a. Dr.^a. Irene de Lourdes Noronha</i>	- Conceito emitido	<i>A</i>	Equivalência	<i>9,5</i>
<i>Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias</i>	- Conceito emitido	<i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
<i>Prof. Dr. José Luiz de Godoy</i>	- Conceito emitido	<i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
<i>Prof. Dr. Julio Cesar Uili Coelho</i>	- Conceito emitido	<i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>

Conceito Final de Avaliação:

A

Curitiba, 20 de novembro de 2002

Prof. Dr. Miguel Carlos Riella

Prof.^a. Dr.^a. Irene de Lourdes Noronha

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Prof. Dr. José Luiz de Godoy

Prof. Dr. Julio Cesar Uili Coelho

*À Eva e Laudir, meus pais, pela
minha educação e incentivo incessável que
me permitiram chegar até aqui.*

*À Denise, minha esposa, pela
grande paciência e compreensão, bem
como pelas críticas e sugestões
primordiais para a minha vida pessoal e
profissional*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas, médico do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, orientador desta tese, pela amizade e pela orientação objetiva e crítica deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo constante apoio, grande amizade e ensinamentos durante minha residência médica.

Ao Professor Dr. Giacomo Piero Basadonna, Chefe do Serviço de Transplante da University of Massachussetts, ex-Professor de Cirurgia da Yale University, pela oportunidade única de aprimoramento profissional, grande amizade e ensinamentos, bem como pelos importantes conselhos que moldaram minha vida pessoal e minha carreira cirúrgica.

Ao Professor Dr. David M. Rothstein, do Serviço de Nefrologia da Yale University pela grande amizade, paciência e dedicação, bem como pelos ensinamentos das técnicas de laboratório e de metodologia científica que possibilitaram a realização dos experimentos desta tese.

Ao Professor Dr. Julio César Uili Coelho, Professor Titular e Chefe do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo da Universidade Federal do Paraná, Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Nossa Senhora das Graças, pelo exemplo de caráter, profissionalismo e dedicação à cirurgia que marcaram minha formação médica, cirúrgica e científica.

À Dra. Charlotte Eielson Ariyan, médica residente do Departamento de Cirurgia da Yale University, pela grande amizade, e pelo paciente, metuculoso e perseverante trabalho diário no laboratório.

A Songyang Deng, Técnico em Laboratório da Yale University, pelo auxílio na realização das cirurgias e no cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

Aos doutores Younbiao Lu, Wataru Matumoto, Sirlester Parker e Jin Tian da Yale University, pelos conselhos, sugestões e críticas construtivas durante a realização da fase experimental deste trabalho.

A Dana Boyce pela paciência maternal e extremo carinho demonstrado a minha pessoa.

Aos doutores Rory E. Morty e Matteo Bassetti, ex-pesquisadores da Yale University, pelas incessáveis horas de discussão científica dispendidas em New Haven.

À Denise pela ajuda durante a revisão final.

À Marina pelo auxílio com a impressão e *layout* final.

À CAPES e JDF International pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.
Aristóteles

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVOS.. ..	04
2 REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1 TRATAMENTO CIRÚRGICO DO DIABETES MELLITUS.....	06
2.1.1 Histórico: das Ilhotas de Langerhans ao Tratamento da Patologia.....	06
2.1.2 Transplante e Diabetes Melittus	08
2.1.3 Transplante de Ilhotas de Langerhans.....	09
2.2 RESPOSTA IMUNE AO ALOENXERTO.....	12
2.2.1 Ativação Linfocitária.....	12
2.2.1.1 Sinal 1 e a molécula CD45.....	13
2.2.1.2 Sinal 1 e expressão de múltiplas formas de CD45.....	14
2.2.1.3 Sinal 2 e a molécula CTLA-4	19
2.3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA.....	21
2.3.1 Indução de Tolerância ao Enxerto.....	21
2.3.2 Imunomodulação do Sinal Co-Estimulatório.....	23
2.3.3 Imunomodulação do Sinal 1 e Anti-CD45.....	26
2.3.4 Imunomodulação Através da Combinação de Anticorpos Monoclonais.....	32
2.3.5 Importância da Exposição ao Antígeno do Doador no Uso de Anticorpos Monoclonais para a Indução de Tolerância Imunológica.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 PROTOCOLOS E ANIMAIS.....	36

3.2 ANESTESIA E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	37
3.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺	38
3.3.1 Isolamento de Esplenócitos e de Soro dos Camundongos	39
3.3.2 Imunofluorescência Direta.....	40
3.3.3 Citometria de Fluxo.....	41
3.3.4 Análise dos Dados de Citometria de Fluxo.....	42
3.3.5 Análise de Anticorpo Residual na Superfície Linfocitária e no Soro.....	43
3.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	43
3.4.1 Animais Submetidos a Transplante de Ilhotas de Langerhans.....	43
3.4.2 Indução de Diabetes Química.....	44
3.4.3 Timectomia.....	45
3.4.4. Transplante das Ilhotas de Langerhans.....	47
3.4.4.1 Injeção de collagenase e pancreatectomia nos doadores.....	47
3.4.4.2 Digestão do tecido exócrino do pâncreas	49
3.4.4.3 Purificação das ilhotas de Langerhans.....	49
3.4.4.4 Pureza e viabilidade das ilhotas de Langerhans.....	50
3.4.4.5 Contagem das ilhotas de Langerhans.....	52
3.4.4.6 Preparo para o implante das ilhotas de Langerhans.....	52
3.4.4.7 Transplante das ilhotas de Langerhans no receptor.....	53
3.4.4.8 Nefrectomia nos receptores dos transplantes de ilhotas de Langerhans.....	55
3.4.4.9 Exposição ao aloantígeno do doador.....	55
3.4.4.10 Cuidados pós-operatórios.....	55
3.4.4.11 Avaliação da glicemia no pós-operatório	56
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS CD4 ⁺ APÓS TRATAMENTO <i>STANDARD</i> COM ANTI-CD45 RB..	57

4.2 EFEITO DO USO DE MÚLTIPLAS DOSES DE ANTI-CD45RB NA SOBREVIDA DO ALOENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS.....	59
4.3 EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E DE CTLA-4 APÓS MÚLTIPLAS DOSES DE ANTI-CD45RB.....	60
4.4 SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NO GRUPO IX.....	62
4.5 CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E CTLA-4 EM LINFÓCITOS CD4 ⁺ APÓS TRATAMENTO COM ANTI-CD45RB NA AUSÊNCIA DO TIMO.....	63
4.6 EFEITO DA TIMECTOMIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS EM ANIMAIS TRATADOS COM ANTI-CD45RB.....	65
4.7 PAPEL DOS LINFÓCITOS CD4 ⁺ CD45RB ^{Low} CTLA-4 ⁺ NO AUMENTO DA SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS MEDIADO POR ANTI-CD45RB.....	66
4.8 AVALIAÇÃO DE ANTICORPO RESIDUAL ANTI-CD45RB NA MEMBRANA DOS LINFÓCITOS CD4 ⁺ E NA CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA APÓS TRATAMENTO STANDARD	67
4.9 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ANTÍGENO DO DOADOR NA SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS MEDIADO POR ANTI-CD45RB.....	68
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO.....	92

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	- antes de Cristo
APC	- Antigen Presenting Cell
CD	- Cluster of Differentiation
CD40L	- Ligante da Célula CD40
CD45RB ^{High}	- Linfócitos T CD4 ⁺ que expressam CD45RB de alto peso molecular
CD45RB ^{Low}	- Linfócitos T CD4 ⁺ que expressam CD45RB de baixo peso molecular
CO ₂	- Gás Carbônico
CTLA-4	- Cytotoxic Lymphocyte Activation 4
CTLA-4-Ig	- Proteína de fusão que bloqueia o receptor de CTLA-4 e CD28
Cy	- Cy-Chrome
DAG	- Diacilglicerolquinase
DST	- Donor Specific Transfusion
EDTA	- Ethylenediamine Tetra-acetic Acid
ev	- via endovenosa
FAS-ligand	- Ligante da molécula FAS
Fc	- porção curta da molécula do anticorpo
FITC	- Fluorescein Isothyocianate
FL1-H	- canal 1 do citômetro de fluxo
FL2-H	- canal 2 do citômetro de fluxo
FL3-H	- canal 3 do citômetro de fluxo
FSC-H	- tamanho das células
G	- Gauge
H-2 ^b	- MHC 2 ^b de camundongo
H-2 ^d	- MHC 2 ^d de camundongo
H-2 ^k	- MHC 2 ^k de camundongo
HB220	- anticorpo monoclonal anti-CD45RB

IACUC	- Comitê Institucional de Cuidados e Uso dos Animais
ICOS	- Inducible Co-Stimulator Marker
IE	- Ilhotas-Equivalentes
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
ip	- Intraperitoneal
IP3	- Inositol 1,4,5-trifosfato
K_2HPO_4	- Hipofosfito de Potássio
Kd	- Kilodaltons
KET/XYL	- Cetamina e Xylestesina
kg	- quilograma
KH_2PO_4	- Hipofosfato de potássio
$KHCO_3$	- Bicarbonato de potássio
MB23G2	- anticorpo monoclonal anti-CD45RB
MHC	- major complex of histocompatibility
ml	- mililitro
mm	- milímetro
n	- número de camundongos
NaCl	- Cloreto de sódio
NFAT	- fator nuclear de células T ativadas
NH_4Cl	- Cloreto de amônio
p	- probabilidade
PBS	- Solução Tampão de Fosfato
PE	- Phycoerithrin
pH	- Potencial hidrogeniônico
PTKs	- Proteintirosinoquinases
PTPs	- Proteintirosinofosfatases
Q15	- a cada 15 dias

RB	- porção restrita do exon B
RNA	- Ácido ribonucleico
RNAm	- RNA mensageiro
SSC-H	- Granularidade das Células
TCR	- Receptor do Linfócito T
TGF	- Tumor Growth Factor
vs	- versus
%	- por cento
/	- por
x	- por
=	- igual
<	- menor
>	- maior
±	- mais ou menos
()	- nenhum exon expresso
-	- negativo
:	- para
γ	- gama
μg	- micrograma
μm	- micrômetro
+	- positivo
+	- e
β	- beta
°C	- graus Celsius
±	- mais ou menos
G0	- síntese do ciclo celular
G1	- replicação do ciclo celular

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FORMAS DE CD45 EXPRESSAS EM LINFÓCITOS T DE HUMANOS E ROEDORES.....	15
TABELA 2 – RECONHECIMENTO DAS FORMAS DE CD45 A DIFERENTES ANTICORPOS MONOCLONAIS EM LINFÓCITOS T DE HUMANOS E ROEDORES.....	15
TABELA 3 – GRUPOS DE ANIMAIS NÃO SUBMETIDOS A TRANSPLANTE.....	38
TABELA 4 – GRUPOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A TRANSPLANTE. DE ILHOTAS DE LANGERHANS.....	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REALIZAÇÃO DE TIMECTOMIA POR SUCCÃO.....	46
FIGURA 2 – CANULAÇÃO DO DUCTO BILIAR PARA INJEÇÃO DE COLAGENASE NO PÂNCREAS.....	48
FIGURA 3 – ASPECTO FINAL DAS ILHOTAS DE LANGERHANS APÓS A PURIFICAÇÃO	51
FIGURA 4 – ILHOTAS DE LANGERHANS APÓS INJEÇÃO NA LOJA SUBCAPSULAR DO RIM.....	54
FIGURA 5 – EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45 (A) E CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4 ⁺ DOS GRUPOS I E II.....	58
FIGURA 6 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS VI, VII E VIII.....	60
FIGURA 7 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB (A) E DE CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4 ⁺ DO GRUPO III.....	61
FIGURA 8 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DO GRUPO IX.....	63
FIGURA 9 - CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB (A) E CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4 ⁺ NOS GRUPOS IV E V.....	64
FIGURA 10 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS X E XI.....	65
FIGURA 11 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS XII, XIII E XIV.....	67
FIGURA 12 – AUSÊNCIA DE ANTICORPO RESIDUAL NA MEMBRANA DOS LINFÓCITOS CD4 ⁺ APÓS DOIS DIAS DA ÚLTIMA DOSE DE ANTI-CD45RB.....	68
FIGURA 13 - SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS XV E XVI.....	69
FIGURA 14 - “JANELA IMUNOLÓGICA” APÓS O TRATAMENTO COM ANTI-CD45RB.....	79

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a cinética dos linfócitos CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺ e se os mesmos melhoram a sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans; analisar os efeitos da administração de um esquema com múltiplas doses de anti-CD45RB na sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans e analisar o papel do timo e da exposição ao antígeno do doador no mecanismo de ação de anti-CD45RB. Foram utilizados camundongos machos BALB/c; C57BL/6b; e DBA/1 com 6-8 semanas de vida. Animais receberam anticorpo monoclonal anti-CD45RB via retrorbital na dose de 100µg nos dias -1, 0 e 5 do transplante. Os animais receberam o enxerto no dia zero. Realizou-se timectomia por sucção no dia -7. Exposição ao aloantígeno foi realizada no dia zero através da injeção de 50 ilhotas de Langerhans no receptor. Novas dosagens de anti-CD45RB foram realizadas através da injeção intraperitoneal de 100µg a cada 15 dias. A cinética da expressão das formas de CD45RB e CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ foi avaliada por fenotipagem seriada dos esplenócitos de camundongos, imunofluorescência direta e citometria de fluxo até que se encontrasse o dia do retorno da expressão das formas de CD45RB e CTLA-4 ao nível basal. Diabetes química foi induzida nos animais através da injeção de estreptozotocina. O pâncreas dos doadores foi digerido com injeção de colagenase e as ilhotas de Langerhans foram purificadas, contadas e transplantadas na loja subcapsular renal. Glicemia acima de 250 mg/dl foi considerada rejeição aguda ao enxerto. Realizou-se uma comparação dois a dois dos grupos de animais submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans em relação à variável tempo de sobrevida dos enxertos, utilizando-se o teste não-paramétrico log-rank. Os resultados demonstraram que a alteração da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 persiste por 17 dias. Camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB seguido de dosagem a cada 15 dias apresentaram menor índice de rejeição aguda precoce, mas este novo esquema terapêutico não aumentou a sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans e não gerou um novo aumento da expressão de CTLA-4. Timectomia alterou a expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 por um período prolongado, mas não possibilitou um aumento da sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans. Houve rejeição aguda do aloenxerto de ilhotas de Langerhans nos animais que o receberam no dia 10 após tratamento *standard* com anti-CD45RB, o que não ocorreu no camundongos que receberam o enxerto no dia 7. Porém, animais que receberam tratamento *standard* e aloenxerto de ilhotas de Langerhans no dia 10 e que foram expostos previamente ao antígeno do doador apresentaram longa sobrevida do aloenxerto. Concluiu-se que as alterações da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 são limitadas. Mesmo com a utilização de múltiplas doses de anti-CD45RB a sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans não foi melhorada. CTLA-4 exerce papel fundamental na sobrevida do aloenxerto mediado por anti-CD45RB. A exposição ao aloantígeno durante o aumento de CTLA-4 é crucial para a ação de anti-CD45RB.

Palavras-chave: Tolerância imunológica; anti-CD45RB, CD45RB, CTLA-4;
Transplante de ilhotas de Langerhans

ABSTRACT

New concepts in the mechanism of action of the monoclonal antibody anti-CD45RB on islet transplantation in mice

The aims of the present study were to evaluate the kinetics and the role of CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺ cells in the mechanism of action of anti-CD45RB, to evaluate the effect of booster doses de anti-CD45RB in allograft survival; as well as the role of the thymus and the exposure to the donor antigen in the mechanism of action of anti-CD45RB mediated allograft survival. 6-8 weeks-old male BALB/c; C57BL/6b; e DBA/1 mice were used. Animals received anti-CD45RB on the dose of 100µg on days -1, 0 and 5 of the transplant. Grafts were implanted on day zero. Thymectomy was performed by suction on day -7. Exposure to donor antigen was performed on day zero through an intraperitoneal injection of 50 islets into the recipient. Re-doses of anti-CD45RB were performed through intraperitoneal injection every 15 days. The kinetics of CD45RB and CTLA-4 expression were analyzed by daily direct immunostaining and flow cytometry of mice splenocytes. Chemical diabetes was induced through streptozocin injection into the recipients. The pancreas of the donors were digested with the use of collagenase. Islets were injected into the subcapsular space of the kidney. Glycemia greater than 250 mg/dl was used for the diagnosis of acute graft rejection. Log-rank test was used to compare graft allograft survival among different groups. The results showed that there was a shift in CD45RB expression and the decay of CTLA-4 expression slowly decreased to pre-treatment levels, persisting for 17 days after treatment. Mice receiving standard treatment followed by booster doses of anti-CD45RB every 15 days presented a low incidence of early rejection. However, re-treatment was not able to augment long-term graft acceptance. After re-dosing, a second shift in CD45RB expression occurs towards the CD45RB^{Low} population. Animals that received a booster dose and have their transplanted delayed to day 18 were not able to sustain islet engraftment. CD45RB and CTLA-4 expression in thymectomized mice did not approach baseline levels on day 17

after treatment, returning to pre-treatment levels 1-week later. Thymectomized mice did not present an additional late allograft survival. However, this group showed a fewer episodes of early rejection. When islet transplantation was delayed to day 10, mice also rejected their grafts early. If the transplantation was delayed to day 7, mice did not rejected their grafts. Mice that have their transplanted delayed to day 10, and at the same time were exposed to donor antigen sustained their grafts for more than 120 days. We concluded that the alterations in CD45RB isoforms and CTLA-4 expression caused by anti-CD45RB were limited. Even the use of multiple doses was not able to optimize anti-CD45RB treatment. CTLA-4 plays a key-role in mediating engraftment through anti-CD45RB. The exposure to the donor antigen during the rising of CTLA-4 is crucial for anti-CD45RB activity.

Key-words: Immunologic tolerance; anti-CD45RB, CD45RB, CTLA-4; Islet Transplantation

1 INTRODUÇÃO

A evolução do conhecimento de imunologia básica e farmacologia geraram drogas imunossupressoras potentes que melhoraram substancialmente o controle dos índices de rejeição aguda ao enxerto. Desta forma, tornou-se possível a realização crescente de transplante de órgãos sólidos^{32,86}.

No entanto, existem riscos graves inerentes a terapia imunossupressora, tais como um aumento no número de infecções e neoplasias, exacerbação da hipertensão arterial, distúrbios no metabolismo do colesterol, do ácido úrico e da glicose^{6,22,72,86}.

Apesar do uso corrente de drogas imunossupressoras, episódios de rejeição aguda ao enxerto ainda ocorrem, contribuindo para piora progressiva da função dos órgãos transplantados a longo e médio prazos¹⁰. Desta forma, torna-se necessário que se busque alternativas que proporcionem a manutenção do funcionamento a longo prazo ou em definitivo de um aloenxerto sem a presença, ou com um número reduzido, de efeitos colaterais^{6,86,99,123}.

Diabetes mellitus acomete 6% da população mundial, ou cerca de 15 milhões de pessoas somente nos Estados Unidos. Esta doença gera complicações vasculares que a caracterizam como a oitava causa de morte nos Estados Unidos; a maior causa de insuficiência renal crônica e cegueira em adultos; bem como a maior causa de amputações de membros inferiores e impotência sexual²⁵.

Quase um século após sua descoberta, terapia com insulina exógena permite controle das complicações metabólicas agudas do *diabetes mellitus*. No entanto, controle intensivo da glicemia apresenta um baixo índice de adesão dos pacientes. Ao mesmo tempo, é responsável por um grande número de episódios, muitas vezes fatais, de hipoglicemia. Além disso, as complicações crônicas da doença ainda ocorrem em um número significativo^{4,21,25,28}.

Atualmente somente o tratamento cirúrgico, através do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans, oferece cura potencial para o *diabetes mellitus*. Ao mesmo tempo, possibilita independência da insulino-terapia, e melhora a qualidade

de vida e a sobrevida dos pacientes diabéticos^{25,42,107}.

O transplante de pâncreas estabelece controle total do metabolismo glicêmico. Previne as complicações crônicas do *diabetes mellitus*, como o espessamento da membrana basal e redução no espaço mesangial. Evita a recorrência da nefropatia diabética em rins previamente transplantados, assim como o avanço das manifestações neurológicas e da retinopatia diabética^{110,111}.

No entanto, o transplante de pâncreas é um procedimento cirúrgico complexo, que apresenta significativa morbidade e requer terapia imunossupressora definitiva⁹⁹. Devido a sua alta morbidade, poucos pacientes diabéticos não-portadores de nefropatia são submetidos ao procedimento, restringindo sua indicação. Como consequência, o transplante de pâncreas é realizado tardiamente na evolução do *diabetes mellitus*^{17,102}.

O transplante das ilhotas de Langerhans apresenta a vantagem de ser um procedimento simples, rápido, de baixa morbi-mortalidade e que, teoricamente, pode ser realizado na fase inicial da doença, antes do aparecimento das complicações crônicas. Recentemente, a utilização de um novo protocolo com dosagem baixa de drogas imunossupressoras e ausência de corticosteróides demonstraram que esta terapia pode ser utilizada como tratamento para o *diabetes mellitus*¹⁰². No entanto, rejeição aguda ainda é o maior obstáculo para a utilização clínica do transplante de ilhotas de Langerhans.

A indução de tolerância imunológica, caracterizada pela ausência de resposta imune ao aloenxerto, tem uma potencial capacidade de controlar totalmente a rejeição aguda às ilhotas de Langerhans, evitando ao mesmo tempo os potenciais efeitos colaterais das drogas imunossupressoras^{6,86,123}.

Recentemente, múltiplas técnicas estão sendo testadas na tentativa de indução de tolerância imunológica. Dentre as mesmas, o uso do anticorpo monoclonal anti-CD45 já demonstrou ser capaz de aumentar a sobrevida do enxerto e induzir tolerância imunológica em modelos experimentais de transplante de ilhotas de Langerhans, coração, pele e rins, em roedores e macacos^{11,19,48,55,90}.

Em estudos de tolerância imunológica, linfócitos CD4 podem ser divididos em duas populações bem distintas de acordo com as formas de CD45 (fosfatases de membrana que exercem papel crucial durante a ativação linfocitária): a primeira (cerca de 58%) denominada CD45RB^{High}, e a segunda (cerca de 42%) denominada CD45RB^{Low}. Os linfócitos T alteram a expressão das formas de CD45 de uma maneira rigidamente regulada durante a seleção tímica e durante a exposição a antígenos na periferia^{30,88}. A expressão das diferentes formas de CD45 é específica para diferentes linhagens e estado de ativação de células hematopoiéticas. No entanto linfócitos individuais expressam simultaneamente mais de uma forma, nos diferentes tipos de linfócitos, de acordo com suas funções distintas e estado de ativação^{12,30,56,82,88,109}.

Em estudos que utilizaram o anticorpo monoclonal anti-CD45RB, os animais tratados com o mesmo também apresentam essas duas populações distintas de linfócitos CD4⁺, mas com proporção modificada. O tratamento com anti-CD45RB causa uma mudança na expressão das formas de CD45RB, aumentando significativamente a proporção de linfócitos CD4⁺CD45RB^{Low} e diminuindo a proporção de linfócitos CD4⁺CD45RB^{High}^{11,27,29}.

Ao mesmo tempo, anti-CD45 altera a secreção de citocinas do enxerto com uma maior produção de IL-4 e 10. Gera um “ambiente imune” incapaz de induzir rejeição aguda e, ao mesmo tempo, gerador de tolerância imunológica¹¹.

Ao aumentar a expressão da molécula inibitória da resposta chamada CTLA-4 nos linfócitos T CD4⁺, sem causar um aumento da ativação celular, anti-CD45RB demonstra poder atuar gerando anergia ou ativação apenas parcial dos linfócitos^{27,29}.

Embora se saiba que o uso de anti-CD45 é capaz de regular resposta imune, novos estudos que forneçam informações a respeito do mecanismo de ação deste anticorpo monoclonal poderão implicar em benefício terapêutico ao se utilizar anti-CD45 como droga imunossupressora ou indutora de tolerância imunológica^{30,88}.

Acredita-se que anti-CD45 apresente mecanismos imunomodulatórios únicos. No entanto, pouco se sabe a respeito de seus mecanismos de ação. Para que esta nova terapia possa ser utilizada em humanos é necessário que se conheça com

detalhes seus mecanismos de ação, sua cinética, ação sobre os linfócitos e sua interação com o enxerto, outros órgãos e células do sistema imune^{12,30,88}.

1.1) OBJETIVOS

O presente estudo visa a elucidar detalhadamente os mecanismos de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. O objetivo central consiste na avaliação do papel da subpopulação linfocitária T $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ na melhora da sobrevida dos aloenxertos de ilhotas de Langerhans. Foram estabelecidas as seguintes hipóteses e objetivos para o presente estudo:

A) Terapia “standard” (doses nos dias -1, 0 e 5) com o uso do anticorpo monoclonal anti-CD45RB induz uma alteração na população linfocitária, gerando células $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$. Assim, este estudo tem como o objetivo principal avaliar se a subpopulação linfocitária que apresenta o fenótipo $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ é a responsável pela melhora da sobrevida do aloenxerto.

B) Não se sabe por quanto tempo esta alteração da população linfocitária persiste e este estudo tem como um dos seus objetivos estudar a cinética desta alteração.

C) Acredita-se que possa haver um incremento no regime de administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Assim, após o conhecimento da cinética da subpopulação linfocitária $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$, um novo regime de administração poderá ser proposto caso se verifique que a re-administração de anti-CD45RB é capaz de induzir uma nova alteração na população linfocitária. Desta forma, este estudo tem como um dos seus objetivos estudar os efeitos da administração de múltiplas doses de anti-CD45RB, de determinar a necessidade, melhor regime para sua utilização, sua eficácia e possível benefício do seu uso.

D) Pode ser postulado que esta mudança da subpopulação linfocitária possa ocorrer em um período de tempo limitado, e que aconteça o ressurgimento de outras populações linfocitárias que sejam as responsáveis pela mediação de rejeição aguda ao

aloenxerto ($CD4^+CD45RB^{High}CTLA-4^-$). Entretanto não se conhece a origem destas novas células, podendo as mesmas apresentar uma mudança de receptores de membrana na circulação periférica ou serem novas células originárias do timo. Este estudo tem como objetivo entender o papel do timo na troca das populações linfocitárias que ocorrem com a administração de anti-CD45RB.

E) Acredita-se que a exposição ao antígeno seja fator fundamental na indução de tolerância imunológica e de aumento da sobrevivência do aloenxerto. Este estudo tem como objetivo estudar a importância e eficácia da exposição ao antígeno do doador no mecanismo de ação de anti-CD45RB.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Diferentes estudos clínicos e modelos experimentais contribuíram para a evolução do tratamento cirúrgico do *diabetes melittus*, do entendimento da resposta imune ao aloenxerto e ao conseqüente desenvolvimento de drogas imunossupressoras e esquemas de indução de tolerância imunológica. Nesta revisão serão apresentados estudos que contribuíram para o conhecimento:

- do tratamento cirúrgico do *diabetes melittus*;
- da resposta imunológica ao aloenxerto;
- dos sinais envolvidos na ativação linfocitária;
- dos mecanismos de imunossupressão aos órgãos sólidos;
- das estratégias envolvidas na indução de tolerância imunológica, e dos mecanismos de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB.

2.1 TRATAMENTO CIRÚRGICO DO DIABETES MELITTUS

2.1.1 Histórico: das Ilhotas de Langerhans ao Tratamento da Patologia

Diabetes melittus é conhecida há mais de 3000 anos. O papiro de Ebers (1550 a.C.) contém a primeira referência histórica à doença, com o relato de uma criança com complicações agudas do diabetes. Em 1857, após estudos de Claude Bernard, surgiu o primeiro indicativo de que *diabetes melittus* é devida a produção excessiva de glicose⁵³.

No entanto, a correlação entre pâncreas e *diabetes melittus* é descoberta relativamente recente na história da medicina. O ainda estudante de Medicina, LANGERHANS descreveu em 1869 a estrutura das ilhotas pancreáticas em secções de

tecido pancreático com o uso de técnicas de transiluminação ⁵³. VON MERING & MINKOWSKI (1890) demonstraram que a remoção cirúrgica do pâncreas em cães é seguida de *diabetes melittus* geralmente fatal. Após a realização de experimentos que visavam a testar a sobrevivência de cães à pancreatectomia total, um funcionário do laboratório notou que a urina dos cães pancreatectomizados atraía moscas, gerando a primeira associação entre *diabetes melittus* e o pâncreas ⁵³.

BANTING, BEST, COLLIP, CAMPBELL e FLETCHER (1922) foram os primeiros a relatar uso de extrato ativo de tecido pancreático em cães e posteriormente em pacientes diabéticos. Extraíram “isletina” do pâncreas de um cão que teve seu ducto pancreático ligado 10 semanas antes. “Isletina” foi então injetada em outro cão, em coma diabético devido a uma pancreatectomia prévia, o qual em pouco tempo recuperou-se do *diabetes melittus*. Este experimento originou posteriormente o isolamento da insulina ⁹. Na segunda metade do século XX, entenderam-se os tipos e as complicações crônicas da doença e que a morbi-mortalidade da mesma estava relacionada ao controle inadequado da glicemia. Ao mesmo tempo, ainda se avançou no controle glicêmico com dieta, insulino-terapia, uso de bombas de infusão constante de insulina e monitores de glicemia ⁴⁷.

Em 1993, o Grupo de Controle e Complicações do Diabetes examinou os efeitos do controle intensivo da glicemia, relacionando-o com a severidade e frequência das complicações do *diabetes melittus*. Pacientes com diabetes tipo I com retinopatia severa, moderada e sem retinopatia foram randomizados para receber:

- a) terapia intensiva de insulina através da administração por bomba externa de insulina;
- b) Três ou mais injeções diárias de insulina, guiadas por monitorização glicêmica frequente ou;
- c) Terapia convencional com uma ou duas doses diárias de insulina.

Os pacientes foram seguidos por uma média de 6,5 anos. O aparecimento ou progressão de retinopatia e outras complicações foram avaliados regularmente e utilizados como parâmetro de comparação entre os grupos. Os resultados

demonstraram que terapia intensiva com manutenção de normoglicemia, preveniu o aparecimento de retinopatia em 76% quando comparado com terapia convencional. Terapia intensiva com manutenção da normoglicemia, reduziu o desenvolvimento de retinopatia em 54%, de microalbuminúria em 39%, de albuminúria em 54% e de neuropatia em 60% quando comparados com a utilização de três ou mais injeções de insulina. No entanto, terapia intensiva de manutenção da normoglicemia aumentou em 2-3 vezes o número de episódios severos de hipoglicemia. Os autores concluíram que a terapia intensiva de manutenção de normoglicemia em pacientes diabéticos do tipo I retarda o aparecimento e desenvolvimento das complicações da doença. No entanto, esta terapia é de difícil execução, resultando em um número excessivo de episódios de hipoglicemia severa ²⁵.

Desta maneira, novas formas de tratamento do *diabetes mellitus* estão sendo investigadas com o objetivo de re-estabelecer os níveis fisiológicos de insulina endógena, mantendo normoglicemia a longo prazo e evitando as complicações crônicas da doença, sem gerar episódios de hipoglicemia. Atualmente, a única terapia capaz de preencher todos estes requisitos é a reposição do tecido pancreático endócrino, através do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans ^{4,21,28,84}.

2.1.2 Transplante e *Diabetes Mellitus*

MINKOWSKI (1892) tentou transplantar o pâncreas, usando um pedículo vascular, no tecido subcutâneo da parede abdominal de cães diabéticos. Na análise de seus resultados não foi observada nenhuma melhora nos níveis glicêmicos ²⁹. GAYET & GUILLAUMIE (1927) realizaram transplante de pâncreas em cães submetidos previamente a uma pancreatectomia total, nos quais os órgãos foram anastomosados à circulação carótida e jugular. Estes foram os primeiros experimentos que resultaram em diminuição significativa da glicemia sangüínea, porém, apenas durante 6 horas ³¹.

O primeiro transplante pancreático foi realizado por KELLY, LILLEHEI, MERKEL, IDEZUKI e GOETZ (University of Minesotta, 1966), envolvendo uma

jovem diabética que recebeu um segmento pancreático e um rim de um cadáver. A paciente tornou-se insulino-independente, mas ambos os órgãos foram subsequentemente removidos devido à rejeição dos enxertos. A paciente faleceu após dois meses da cirurgia ⁴³. Estes autores realizaram mais 12 transplantes durante a década de 60, mas somente um paciente apresentou enxerto funcional e insulino-independência após um ano da cirurgia ⁶⁰.

Atualmente, segundo dados do Registro Internacional de Transplante de Pâncreas (Minneapolis, EUA), mais de 15.000 transplantes de pâncreas já foram realizados no mundo (mais de 1.500/ano entre 1997-2000) ³⁴. Excelentes resultados têm sido obtidos em centros de excelência, com diminuição da mortalidade cirúrgica e progressiva melhora da sobrevida do enxerto, proporcionando insulino-independência e melhora na qualidade de vida aos pacientes ^{26,42,110,113}.

Embora o transplante pancreático ofereça controle do diabetes, o transplante das ilhotas de Langerhans apresenta a vantagem de ser um procedimento simples, rápido e de baixa morbi-mortalidade. Pode ser realizado, teoricamente, na fase inicial da diabetes, antes do aparecimento de complicações crônicas podendo gerar cura da doença.

2.1.3 Transplante de Ilhotas de Langerhans

BENSLEY (1911) realizou o primeiro isolamento de ilhotas de Langerhans em porcos-da-guiné com o intuito de estudar sua morfologia ¹³. Sucederam-se décadas de tentativas frustradas de transplantar um enxerto funcional, com contribuições no isolamento das ilhotas de Langerhans: HELLERSTROM (1964) introduziu o uso do microscópio de dissecação como parte da técnica de isolamento; MOSKALEWSKI (1965) foi o primeiro a utilizar a enzima colagenase para separar o tecido exócrino pancreático; e LACY & KOSTIANOVSKY (1967) introduziram o método de distensão do pâncreas com solução salina balanceada de Hanks através de canulação do ducto biliar comum ^{40,54,68}.

Deve-se a BALLINGER & LACY (1972) o primeiro transplante de ilhotas de Langerhans com bons resultados a longo prazo, em um estudo realizado em ratos. Foram eles também os primeiros a utilizar o isolamento das ilhotas do resto do tecido pancreático através do método de gradiente de densidade com o uso da solução de Ficoll[®]. Realizaram isoenxertos e alonxertos em roedores, utilizando ratos Wistar como doadores e ratos Lewis diabéticos como receptores (neste grupo foi usada imunossupressão com azatioprina). As ilhotas de Langerhans foram transplantadas na cavidade peritoneal ou no músculo da coxa dos animais. Ao final de 3 meses, os receptores apresentavam-se normoglicêmicos. Os aloenxertos foram avaliados durante 5 semanas e neste período 50% dos animais permaneceram normoglicêmicos. Os autores concluíram que foi possível isolar as ilhotas de Langerhans de ratos e que o transplante de 400-600 ilhotas de Langerhans foi capaz de reverter a hiperglicemia, mantendo níveis glicêmicos normais por um tempo prolongado ⁸.

A primeira série de transplante de ilhotas de Langerhans em humanos foi descrita pelo grupo de Minneapolis. NAJARIAN, SUTHERLAND, MATAS, STEFFES, SIMMONS e GOETZ (1977) realizaram 10 infusões de ilhotas de Langerhans, obtidas de 4 cadáveres, em 7 pacientes que haviam recebidos transplante renal prévio. Foram utilizadas infusões na veia porta e intraperitoneais. Na verdade insulino-terapia nunca foi descontinuada, peptídeo-C nunca detectado e os níveis glicêmicos pós-transplante foram aproximadamente 85% dos obtidos pré-transplante. No entanto, este estudo demonstrou que o transplante de ilhotas de Langerhans não causa peritonite e mantém a pressão portal em níveis normais com preservação da função hepática e renal. Os autores concluíram que embora a *diabetes mellitus* não tenha sido melhorada, o procedimento era seguro e não alterava a função do rim previamente transplantado ⁷⁰.

GOTOH, MAKI, KIYOIZUMI, SATOMI e MONACO (1985) descreveram o método de digestão do tecido pancreático através da injeção da solução de colagenase pelo ducto biliar comum para a distensão do pâncreas, o que permitiu o isolamento de um maior número de ilhotas de Langerhans do doador ³³.

RICORDI, LACY, FINKE, OLACK e SHARP (1988) descreveram o isolamento automático das ilhotas de Langerhans em humanos, o que possibilitou menor trauma, melhor digestão do tecido pancreático com um maior número de ilhotas puras durante o processo de isolamento ⁸³.

SHARP, LACY, SANTIAGO, MCMULLOUGH, WEIDE, BOYLE, FALQUI, MARCHETTI, RICORDI, GINGERICH, JAFFE, CRYER, HANTY, ANDERSON e FLY (1991), da Washington University (Saint Louis, MO, EUA) descreveram a primeira série de pacientes que se tornaram temporariamente insulino-independentes através do transplante de ilhotas de Langerhans. Realizaram 9 infusões consecutivas de ilhotas de Langerhans em 7 pacientes diabéticos. Os primeiros três pacientes rejeitaram seus enxertos na segunda semana pós-transplante. Posteriormente 3 pacientes receberam maior número de ilhotas de Langerhans ($13,916 \pm 556/\text{kg}$) e um deles obteve independência da insulina dos dias 10-25 pós-transplante, quando apresentou um episódio de rejeição aguda. Finalmente, o último paciente da série continuou insulino-independente por 154 dias pós-transplante. Todos os pacientes que tiveram enxerto funcionando perderam-no devido a episódios de rejeição aguda. Os autores concluíram que transplante de ilhotas de Langerhans era capaz de permitir independência de insulina em pacientes diabéticos do tipo I ⁹⁷.

SHARP, MARCHETTI, SWANSON, NEWTON, MCMULLOUGH e OLACK (1992) estudaram a importância da massa de ilhotas de Langerhans transplantadas em cães. Verificaram que a sobrevivência do enxerto estava relacionada com o número de ilhotas de Langerhans transplantadas e introduziram o conceito do número de ilhotas-equivalentes (IE), sendo que 1IE = uma ilhota de Langerhans de $150\mu\text{m}$ de diâmetro ⁹⁶.

LINETSKY, BOTTINO, LEHMANN, ALEJANDRO, INVERARDI e RICORDI (1997) foram os primeiros a relatar a digestão de pâncreas humanos com um subtipo de colagenase altamente purificada (Liberase[®]). Esta possibilita um maior número e tamanho de ilhotas de Langerhans recuperadas por doador. Ao mesmo tempo, conseguiu-se maior eficácia e reprodutibilidade no isolamento de ilhotas de

Langerhans⁶¹.

SHAPIRO, LAKEY, RYAN, KORBUTT, TOTH, WARNOCK, KNETEMAN e RAJOTTE (2000), da Universidade de Edmonton no Canadá, foram os primeiros a descrever resultados satisfatórios de transplantes de ilhotas de Langerhans em humanos. Utilizaram para isso uma maior massa de ilhotas de Langerhans transplantadas (maior que 10.000 IE/kg), em 2-4 infusões na veia porta, utilizando radioscopia e acesso percutâneo. Adicionalmente modificaram o esquema de drogas imunossupressoras, evitando o uso de corticóides e utilizando baixas doses de Rapamicina e Tacrolimus. Após um ano de seguimento os 7 pacientes do estudo (100%) apresentavam-se normoglicêmicos, sem episódios de rejeição, com enxertos funcionantes e independentes de insulina¹⁰². Após publicação dos resultados do grupo de Edmonton, um estudo multicêntrico com centros de estudo em Edmonton (Canadá); Minneapolis, Miami, Seattle, St. Louis, e Boston (EUA); Giessen (Alemanha), Milão (Itália), Geneva (Suíça) estão investigando os resultados deste novo protocolo em um número maior de pacientes, com acompanhamento a longo prazo.

Os principais obstáculos que ainda devem ser vencidos para que o transplante de ilhotas de Langerhans se torne uma rotina clínica e possa curar o *diabete melitus* são: melhoria das técnicas de isolamento e purificação; aquisição de técnicas de monitorização do enxerto; controle da resposta ao aloenxerto com uso mínimo de drogas imunossupressoras e se possível com a indução de tolerância imunológica¹⁷.

2.2 RESPOSTA IMUNE AO ALOENXERTO

2.2.1 Ativação Linfocitária

Quando o receptor dos linfócitos T (TCR) reconhece um MHC “invasor”, aquele sofre uma modificação estrutural, resultando na modificação das moléculas de superfície linfocitária. Este evento desencadeia a iniciação de uma cascata de sinais

intracelulares dependentes de um complexo, conhecido como CD3. Este complexo transferirá o reconhecimento de MHC “intruso” da superfície linfocitária para o citoplasma das mesmas e, posteriormente, para o núcleo celular. Gerou-se desta forma como produto final a liberação de citocinas, o que culminou com a divisão celular ²⁹.

Ao conjunto de sinais gerados pelo reconhecimento de um MHC de antígeno “intruso”, reconhecido pelo TCR denomina-se sinal 1 da ativação linfocitária e a cascata de sinais intracelulares, sinal de transdução ⁸². Para que ocorra a proliferação de um clone de linfócitos T específicos a um determinado antígeno, as células apresentadoras do antígeno (APCs) devem estimular os linfócitos T através de moléculas co-estimuladoras presentes nas membranas celulares das APCs, que se ligam a outros receptores dos linfócitos T. A interação entre estas moléculas nas APCs e seus respectivos locais de ligação nos linfócitos T geram um sinal co-estimulatório (sinal 2). Estas moléculas estabilizam a interação entre APCs, linfócitos T e células “invasoras”, aumentam a afinidade entre TCR e antígeno, e geram também sinal intracelular (transdução) independente para ativação e proliferação linfocitária ^{24,39,86}.

Após o reconhecimento do antígeno e desencadeamento dos sinais intracelulares (sinais 1 e 2), os linfócitos T CD4 produzem Interleucina (IL)-2 e outras citocinas. Estas citocinas encaixam-se nos seus respectivos receptores e locais de ligação na membrana celular de diferentes células do sistema imune. Então é gerado um terceiro sinal (sinal 3) que permite que as mesmas células do sistema imune entrem no processo de divisão celular e sejam capazes de destruir o aloantígeno ³⁹.

2.2.1.1 Sinal 1 e a molécula CD45

A fosforilação da tirosina é o evento intracelular mais precoce após o estímulo do TCR (sinal 1) ⁴⁶. A transdução de alguns sinais através da membrana celular é mediada pela fosforilação da tirosina e depende do balanço enzimático entre as proteintirosinoquinases (PTKs) e proteintirosinofosfatases (PTPs) ⁵². Nos linfócitos, a transdução de sinais e a resposta biológica mediada por receptores de

superfície antígeno-específicos necessitam da expressão de PTPs transmembranosas. CD45 é uma família de PTPs contidos nos leucócitos, que exercem uma função crítica na regulação da ativação dos linfócitos T através do TCR, modulando o sinal 1¹¹⁵.

A expressão de CD45 é necessária para o aumento da fosforilação da tirosina intracelular. Isto ocorre após a ativação do linfócito T CD4 através da interação do antígeno ligado ao MHC das APCs e do TCR e que depende das PTKs p59fyn e p56lck e da concentração intracelular de cálcio^{27,51}. As PTKs p59fyn e p56lck normalmente se encontram fosforiladas no linfócito T em repouso. Logo, após a ativação do linfócito T, CD45 defosforila as PTKs, tornando-as ativas e iniciando uma cascata de reações. Estas produzirão como eventos finais DAG (diacilglicerolquinase), IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato), e as enzimas Vav e Shc, que irão ativar três diferentes vias dos fatores de transcrição: a) proteinoquinase C que irá ativar mensageiros secundários como fatores de transcrição intranucleares; b) cálcio, ativando calciocalmodulina, sensível a calcineurina, que por sua vez ativa o fator de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas); c) uma cascata enzimática, que por fim ativa fatores de transcrição. Essa cadeia de reações é suscetível a modificações na expressão de CD45 e de outras proteínas na membrana celular componentes do TCR (sinal 1)^{73,120}.

2.2.1.2 Sinal 1 e expressão de múltiplas formas de CD45

O gene responsável pela transcrição da proteína CD45 está mapeado no cromossomo 1 e é composto por 34 segmentos. Diferentes formas de CD45 podem ser geradas através da transcrição dos exons 4, 5 e 6 (inicialmente conhecidos por segmentos A, B e C), dando origem a diferentes seqüências de aminoácidos localizadas na extremidade distal do segmento extracelular^{29,89,115}. As formas mais comuns de CD45 encontradas em humanos e roedores estão apresentadas na Tabela 1^{20,38,85,89}.

TABELA 1 – FORMAS DE CD45 EXPRESSAS EM LINFÓCITOS T DE HUMANOS E ROEDORES

Exon	Peso Molecular (Kd)	Roedores	Humanos
()	180	++	++
B	190	++	++
BC	205	+	++
AB	205	+/-	++
ABC	220	+/-	++

() – nenhum exon expresso; Kd - Kilodaltons,+: positivo,-: negativo

A porção extracelular da estrutura da proteína CD45 pode ser reconhecida por anticorpos específicos, sendo utilizado assim como marcador de superfície da membrana linfocitária. Enquanto alguns anticorpos existentes contra CD45 reconhecem epítopes comuns a todas as possíveis formas expressas, outros reconhecem epítopes restritos a um exon específico (Tabela 2). Desta maneira, o anticorpo denominado pan-anti-CD45 é capaz de reconhecer um segmento da proteína CD45 comum a todas as possíveis combinações dos exons 4, 5 e 6; enquanto anticorpo monoclonal anti-CD45RB, reconhece uma porção restrita (R) da proteína formada por aminoácidos transcritos a partir do exon cromossômico 5 (B) – Tabela 2^{11,16}.

TABELA 2 – RECONHECIMENTO DAS FORMAS DE CD45 A DIFERENTES ANTICORPOS MONOCLONAIS EM LINFÓCITOS T DE HUMANOS E ROEDORES

Exon	Anti-CD45	Anti-CD45RO	Anti-CD45RB	Anti-CD45RA
()	+	+	-	-
B	+	-	+	-
BC	+	-	+	-
AB	+	-	+	+
ABC	+	-	+	+

() – nenhum exon expresso, +: positivo, -: negativo

Com o uso do anticorpo monoclonal anti-CD45RB, as formas de CD45RB podem ser utilizadas como um marcador de membrana para dividir os linfócitos T CD4 em duas subpopulações: linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de alto peso molecular (CD45RB^{High}) e linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de baixo peso molecular (CD45RB^{Low}). A subpopulação CD45RB^{High} expressa em sua membrana uma grande quantidade de moléculas de CD45 formadas por aminoácidos transcritos a partir dos segmentos A+B, B+C ou B isoladamente. A subpopulação CD45RB^{Low} expressa em sua membrana pouca quantidade de moléculas de CD45 formadas por aminoácidos transcritos a partir do segmento B isoladamente. Esta última também expressa grande quantidade de moléculas formadas por aminoácidos transcritos a partir dos segmentos cromossômicos que não os variáveis, não-reconhecidas pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB^{11,16}.

BOTTOMLY, LUQMAN, GREENBAUM, CARDING, WEST, PASQUALINI e MURPHY (1989) demonstraram que a divisão dos linfócitos T CD4 de acordo com expressão das diferentes formas de CD45 é acompanhada de uma heterogeneidade funcional, podendo significar que estas subpopulações linfocitárias possuem estágios diferentes de diferenciação ou especialização dos linfócitos T CD4. Quando submetidos a uma variedade de estímulos mitogênicos *in vitro*, os linfócitos CD45RB^{High} produziram altas quantidades de IL-2 e IFN- γ e baixas quantidades de IL-4 e 10. Ao contrário, os linfócitos CD45RB^{Low} produziram IL-4 e 10 e pouca quantidade de IL-2 e IFN- γ . Os autores concluíram que em camundongos as subpopulações de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto e de baixo peso molecular equivalem, na realidade, a duas subpopulações distintas de linfócitos CD4 no aspecto funcional¹⁶.

Estas diferentes subpopulações linfocitárias também já demonstraram diferentes atividades imunoregulatórias *in vivo* em modelos experimentais de doenças auto-imunes, transplantes e de estudo de memória imunológica. POWRIE, LEACH, MAUZE, CADDLE e COFFMAN (1993) estudaram se os linfócitos T CD4 de camundongos poderiam ser funcionalmente subdivididos em duas frações baseadas na

expressão da forma de CD45RB prevalente na superfície celular. Estas duas subpopulações linfocitárias foram injetadas em camundongos imunodeficientes. Os animais que tiveram seu sistema imune restaurado com linfócitos CD45RB^{High} desenvolveram uma doença imunoproliferativa letal com infiltrados severos de células mononucleares no cólon e níveis elevados de IFN- γ . Em contraste, camundongos que tiveram seu sistema imune restaurado com linfócitos CD45RB^{Low} ou população completa de linfócitos T CD4 não desenvolveram doença imunoproliferativa ou colite. O achado mais importante foi que a co-transferência da população de linfócitos CD45RB^{Low} junto com a população CD45RB^{High} preveniu o desenvolvimento de doença imunoproliferativa e colite. Os autores concluíram que existe uma função distinta destas duas populações linfocitárias e que mecanismos regulatórios importantes ocorrem entre linfócitos T CD4⁺CD45RB^{High} e CD45RB^{Low} ⁸⁰. Outros modelos de doenças auto-imunes também confirmaram uma função distinta das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ CD45RB^{High} e CD45RB^{Low} ⁷⁹.

HARA, KINGSLEY, NIIMI, READ, TURVEY, BUSHELL, MORRIS, POWRIE, e KOOD (2001) estudaram qual destas duas subpopulações linfocitárias era capaz de mediar rejeição aguda em um modelo murino de transplante de pele. Restauraram o sistema imune de camundongos imunodeficientes, que receberam um transplante de pele, com uma destas duas subpopulações e observaram o funcionamento do enxerto. Animais que receberam linfócitos CD45RB^{High} rejeitaram o enxerto. Em contraste, camundongos que receberam linfócitos T CD4⁺CD45RB^{Low} não apresentaram rejeição aguda. Quando esta mesma população foi transferida junto com a população que gerou rejeição (CD45RB^{High}), os animais não demonstraram sinais de rejeição. Sugeriu-se que a subpopulação de células CD45RB^{Low} regulou a ação das células CD45RB^{High} indutoras de rejeição aguda. A análise dos mecanismos de imunorregulação gerada pela subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{Low} demonstrou que a mesma é antígeno específica e pode ser inibida por anticorpos que bloqueiam a função da IL-10. As células CD45RB^{Low} também não apresentaram proliferação *in vitro* e capacidade imunorregulatória sobre a proliferação de linfócitos

T CD4⁺CD45RB^{High}. Os autores concluíram que há uma capacidade de imunorregulação específica da população de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{Low} que se faz responsável pela não responsividade ao antígeno, bloqueio da rejeição aguda e manutenção da tolerância aos aloantígenos do doador ³⁶.

A distinção funcional das subpopulações linfocitárias que expressam diferentes formas de CD45RB gerou ainda a idéia que as mesmas corresponderiam a linfócitos “virgens” (não expostos a nenhum antígeno), provenientes do timo (CD45RB^{High}) e de memória (CD45RB^{Low}). Hoje, sabe-se que a expressão das diversas formas de CD45 em linfócitos T CD4 é dinâmica e controlada. Linfócitos T alteram a expressão da forma de CD45 de uma maneira altamente regulada durante a seleção tímica e durante a exposição a antígenos na periferia ⁷³. Estudos mais recentes, demonstraram que a expressão das formas de CD45 pode ser alterada e revertida em diferentes períodos. Ao contrário do que se presumia inicialmente, linfócitos de memória também podem expressar o fenótipo CD45RB^{High} ^{12,56,111}. Sabe-se também que a expressão das diversas formas de CD45 em linfócitos T CD4 é específica para diferentes linhagens e estado de ativação das células hematopoéticas. No entanto, populações linfocitárias e expressam e em diferentes porcentagens mais de uma forma, de acordo com funções distintas e estado de ativação ^{49,50}.

Assim, embora não se conheça a exata função de cada subpopulação de linfócitos, sabe-se que a subpopulação CD45RB^{High} secreta mais IL-2 e IFN- γ . Também tem sido mais associada com doenças auto-imunes e, em modelos experimentais de transplante, com rejeição aguda ao aloenxerto. A subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{Low} tem sido associada com memória imunológica, prevenção de doenças auto-imunes, secreção de IL-4 e 10, supressão e regulação do sistema imune, prevenção e/ou reversão de rejeição aguda ao aloenxerto e indução de tolerância imunológica em modelos experimentais de transplante.

2.2.1.3 Sinal 2 e a molécula CTLA-4

A estimulação do TCR *per se* é insuficiente para induzir ativação e proliferação celular. A presença isolada do sinal 1 induz a célula a um estado de anergia ou apoptose, não se verificando *in vitro e in vivo* a expansão clonal linfocitária específica ao antígeno^{57,98,99,100,103,121}.

Para isto, um grande número de moléculas agem simultaneamente na estimulação do TCR e proliferação linfocitária. Estas moléculas compõem um grupo de glicoproteínas de membrana dos linfócitos T e com seus respectivos ligantes nas APCs. Ao contato entre linfócito T, antígeno e APC através do TCR e destas diferentes moléculas dá-se o nome de “sinapse imunológica”²⁴.

O resultado desta interação gera um sinal co-estimulatório (sinal 2) para a ativação e proliferação linfocitária e resposta ao aloantígeno. Destacam-se as moléculas CD28, CTLA-4 (nos linfócitos T CD4) e seus ligantes B7-1, B7-2 (nas APCs), CD40 (nas APCs) e seu ligante CD40L (nos linfócitos T CD4). Mais recentemente novas moléculas integrantes do sinal 2 foram descobertas. Assim, intensa investigação vem sendo realizada para que se descubra o papel das mesmas: moléculas de adesão; ICOS; PD-1, e seus respectivos ligantes na resposta imune ao aloenxerto, bem como o potencial terapêutico das mesmas na indução de tolerância imunológica^{18,95}.

Atualmente, a via CTLA-4-B7 é foco de intenso estudo em diversos modelos experimentais de transplante². Sabe-se que a molécula CTLA-4 exerce potente sinal negativo para o sistema imunológico e que compete com CD28 pelos mesmos ligantes (as moléculas B7-1 e B7-2). Desta forma foi produzida a molécula CTLA-4-Ig, pela fusão de CTLA-4 murino com uma cadeia pesada Fc, o que lhe confere a propriedade de ligar-se com as moléculas B7-1 e B7-2 na superfície das APCs, competindo com CD28 pelo receptor B7 e bloqueando o sinal co-estimulatório^{57,69}. Importante informação foi ainda acrescentada a função da molécula CTLA-4 após a observação de que camundongos com a ausência do gene que codificaria esta proteína desenvolveram

rapidamente doença imunoproliferativa de rápido desenvolvimento e letalidade, demonstrando que CTLA-4 funciona realmente como “freio” da resposta imune^{113,119}. Também se sabe que a ativação linfocitária aumenta a expressão da molécula CTLA-4 nos linfócitos T. Esta molécula parece ser a responsável pelo controle inibitório da expansão da resposta imune ao aloantígeno^{2,63}. Anticorpos anti-CTLA-4 bloqueiam *in vivo* esta via co-estimulatória e aumentam a resposta ao aloantígeno gerando rejeição aguda ao enxerto, exacerbando doença auto-imune e impedindo a obtenção de tolerância imunológica.

METZ, FARBER, TAYLOR e BOTTOMLY (1998) determinaram o papel das moléculas co-estimulatórias (sinal 2) na ativação de linfócitos CD45RB^{Low}. Para isto investigaram a função da via CD28-CTLA-4 na resposta imune. Os resultados demonstraram que a proliferação dos linfócitos T CD4 de memória é dependente do sinal co-estimulatório e que a subpopulação linfocitária CD45RB^{Low}, ao contrário de linfócitos CD45RB^{High}, expressa CTLA-4. Também foi demonstrado que a subpopulação de linfócitos CD45RB^{Low} recicla a molécula de CTLA-4 constantemente entre o citoplasma e a superfície celular. Soube-se então que o bloqueio da via CTLA-4-B7 não altera a proliferação da subpopulação de linfócitos CD45RB^{High}, mas faz com que a subpopulação de linfócitos CD45RB^{Low} prolifere, o que não ocorre em condições basais. Desta maneira, os autores concluíram que a molécula CTLA-4, além de ser uma grande reguladora inibitória da resposta imune, é também a responsável pela manutenção da não responsividade da subpopulação dos linfócitos CD45RB^{Low}. Já que esta população apresenta uma maior expressão desta molécula e pode ser assim considerada linfócitos T CD4⁺ CD45RB^{Low} CTLA-4⁺⁶⁷.

READ, MALSTROM e POWRIE (2000) estudaram o fenótipo das células que controlam doenças auto-imunes do intestino em um modelo experimental de colite auto-imune. Os resultados revelaram que a função imunossupressiva destas células é dependente da sinalização negativa via molécula CTLA-4 e de secreção da citocina TGF-β. O estudo do fenótipo das células que regulam a doença auto-imune intestinal demonstrou que os linfócitos T CD4 expressam CTLA-4. Os autores concluíram que a

identificação desta via como regulatória e supressiva pode facilitar a caracterização destas células como alvos de futuras estratégias terapêuticas⁸².

SALOMON, LENSCHOW, RHEE, ASHOURIAN, SINGH, SHARPE e BLUESTONE (2000) realizaram estudo experimental para verificar o efeito da ausência do sinal co-estimulatório mediado por CD28 e CTLA-4 em um modelo experimental de diabetes auto-imune em camundongos (camundongos NOD). Os resultados demonstraram que a transferência da subpopulação de células regulatórias CTLA-4⁺ evitava o desenvolvimento da *diabetes mellitus*. Os autores concluíram que CTLA-4 é essencial para o desenvolvimento e homeostasia das células regulatórias que controlam o desenvolvimento da *diabetes mellitus* auto-imune⁹³.

Desta forma, CTLA-4 é considerado como sinal co-estimulatório negativo ou contra-regulador da resposta imune, sendo também fundamental para a imunomodulação e indução de tolerância imunológica. Infelizmente, a inexistência de um agonista solúvel para a molécula CTLA-4 tem frustrado as tentativas de utilizar esta via como inibitória da resposta imune sistêmica. Novas estratégias que gerem um aumento da inibição imune através do aumento de CTLA-4 poderão tornar-se importantes componentes de protocolos de imunossupressão e de indução de tolerância imunológica^{64,66,78}.

2.3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

2.3.1 Indução de Tolerância ao Enxerto

Tolerância imunológica pode ser definida de duas maneiras complementares: clinicamente (ou funcionalmente) como a sobrevivência de tecido alogeneico em recipientes normais na ausência de uso de drogas imunossupressoras e; imunologicamente como a ausência de resposta imune a antígeno específicos (contidos no enxerto), com presença de resposta imune preservada a demais antígenos^{6,86,101}.

Várias estratégias já foram utilizadas para a indução de tolerância imunológica. Dentre elas destacam-se: a redução da antigenicidade do enxerto; uso de locais imunologicamente privilegiados do organismo; alteração da diferenciação de subpopulações linfocitárias no timo ou na circulação periférica. Tolerância imunológica pode ser induzida através de diferentes mecanismos: anergia (refratividade a ativação linfocitária); deleção (destruição de subpopulações linfocitárias que geram rejeição); ignorância (indução de subpopulação linfocitária que não reaja contra o enxerto); quimerismo (criação de população linfocitária mista do doador e receptor, gerando ausência de resposta imune); desvio imune (desvio da resposta imune na direção de determinada população celular) e; imunorregulação (subpopulação linfocitária que pode regular ou suprimir outras subpopulações, modulando a resposta imune). Estes mecanismos não são únicos ou mutuamente exclusivos e, de fato, múltiplos mecanismos de ação podem ocorrer e contribuir para a indução de tolerância imunológica ao aloenxerto em um determinado protocolo ^{6,86}.

As alternativas mais promissoras para indução de tolerância imunológica são estratégias que induzam um estado de anergia, imunossupressão ou ignorância específica aos antígenos do doador, presentes em um determinado enxerto. Desta forma, a resposta imune seria normal contra qualquer outro antígeno presente no organismo do receptor do transplante, havendo apenas ausência de uma resposta imunológica ao aloenxerto, com preservação da atividade do sistema imune contra outros antígenos. Embora de difícil obtenção em primatas e humanos, diversos protocolos já foram capazes de induzir tolerância imunológica ao aloenxerto em modelos experimentais que utilizaram roedores.

Os artigos sumarizados abaixo representam diferentes estratégias para a indução de tolerância imunológica em roedores, através da modulação do sistema imunológico (imunomodulação) pelo uso de anticorpos monoclonais e proteínas específicas que alteram diferentes fases da ativação linfocitária.

2.3.2 Imunomodulação do Sinal Co-Estimulatório

TRAN, NICKERSON, RESTIFO, IVIS-WOODWARD, PATEL, ALLEN, STROM e O'CONNELL (1997) testaram o uso de CTLA-4-Ig como indutora de tolerância imunológica em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans. Camundongos BALB/c foram usados como doadores e camundongos B6AF1 diabéticos receberam os enxertos abaixo da cápsula renal. CTLA-4-Ig foi administrado aos animais via intraperitoneal (100 µg) em dias alternados, durante 14 dias (grupo 1), ou em dose única de 500 µg no 2º dia pós-transplante (grupo 2). No grupo 1 mais de 90% dos animais permaneceram normoglicêmicos durante mais de 100 dias após o transplante, ocorrendo o mesmo no grupo 2. Após 100 dias os animais foram submetidos à nefrectomia, resultando em hiperglicemia. As ilhotas de camundongos BALB/c ou de uma terceira linhagem foram então transplantadas novamente no rim remanescente. Os animais do grupo 1 aceitaram o enxerto, mas os do grupo 2 desenvolveram rejeição. Submetidos ainda a enxerto de pele proveniente de camundongos BALB/c, os camundongos do grupo 2 tiveram sobrevida do enxerto mais longa (38 dias) do que o grupo controle composto por camundongos B6AF1 sem tratamento (13 dias). Os autores concluíram que a administração sistêmica de CTLA-4-Ig gera tolerância imunológica neste modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans ¹¹⁴.

WOODWARD, BAYER, CHAVIN, BLUE e BALIGA (1998) testaram se o bloqueio do sinal co-estimulatório da via CD28-B7 era capaz de prolongar a vida média do enxerto em um modelo de transplante cardíaco em camundongos. Utilizaram corações de camundongos C57BL/6J como aloenxertos a serem implantados em camundongos CBA/J e bloqueio do sinal co-estimulatório através do uso de anticorpos monoclonais a B7-1 e B7-2 (anti-CD80 e anti-CD86 respectivamente), administrado via endovenosa no dia do transplante e em diversas doses em dias subsequentes. A utilização individual de ambos os anticorpos, anti-CD80 (29,8±1,5 dias) e anti-CD86 (média de 31 dias) aumentou a sobrevida do enxerto em relação aos animais que não

receberam tratamento (média de 11 dias). Quando ambos os anticorpos foram utilizados no dia do transplante e em três dias após a cirurgia, a sobrevida do aloenxerto foi prolongada para mais de 80 dias. Esta combinação também foi capaz de suprimir proliferação linfocitária ao aloantígeno *in vitro* e a produção de RNA para as IL-4, 10, 12, e 15 no enxerto. Os autores concluíram que anti-CD80 e/ou anti-CD86 são potentes imunomoduladores da resposta immune ao aloenxerto. Terapia combinada de bloqueio aos ligantes de B7 apresenta capacidade de bloquear a resposta immune ao aloenxerto, prolongando a vida média do aloenxerto e suprimindo a proliferação linfocitária ¹²³.

TARUMI, MURAKAMI, YAGIHASHI, NAKAGAWA, HIRATA e UEDE (1999) testaram o uso de CTLA-4-Ig como indutor da não reatividade celular *in vitro* e *in vivo* em um modelo de transplante de intestino em ratos. Como doadores foram usados ratos Brown-Norway e como receptores ratos Lewis. Os receptores foram tratados com injeção de CTLA4-Ig ou de Imunoglobulina IgG (controles) por 7 dias. Animais tratados com CTLA4-Ig apresentaram aumento da sobrevida do enxerto, enquanto que, os animais do grupo controle morreram 16 dias após o transplante. Para testar se houve o estabelecimento de um estado de tolerância imunológica nos animais que apresentaram aumento da sobrevida do enxerto, um segundo transplante foi realizado, utilizando intestinos de ratos Brown-Norway ou ACI. Foi demonstrado que intestinos de ratos Brown-Norway não foram rejeitados, enquanto que ratos ACI foram rejeitados em 10 dias. A concentração sérica de IL-2 encontrava-se reduzida a metade em ratos tratados com CTLA4-Ig em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que CTLA-4-Ig induz tolerância imunológica em ratos submetidos a transplante de intestino ¹¹².

DENGLER, SZABO, SIDO, NOTTMEYER, ZIMMERMAN, VAHL, HUNIG e MEUER (1999) estudaram se o bloqueio seletivo da via CD28-B7 era capaz de induzir tolerância imunológica em um modelo de transplante cardíaco em ratos. Utilizaram o anticorpo monoclonal anti-CD28 em um modelo de transplante cardíaco que utilizou ratos DA como doadores e Lewis como receptores. Animais que

receberam tratamento apresentaram um aumento da sobrevida do enxerto em relação a animais não tratados. Dose-dependência também foi observada, já que, melhores resultados foram adquiridos com maior número de doses (8 doses) apresentando resultado mais satisfatório. Com a modulação do receptor CD28 não houve depleção linfocitária, mas ocorreu uma hiporesponsividade *in vitro*. Os autores concluíram que o bloqueio seletivo de CD28, permitindo que apenas a inibição via CTLA-4 atue como sinal co-estimulatório, não apresenta aplicação clínica ²³.

OZKAYNAK, GAO, SHEMMERI, WANG, GUTIERREZ-RAMOS, AMARAL, QIN, ROTTMAN, COYLE e HANCOCK (2001) estudaram o papel da molécula co-estimulatória ICOS na supressão da ativação linfocitária e liberação de citocinas em um modelo murino de transplante cardíaco. Os resultados demonstraram que bloqueio da via ICOS-ICOSL através do uso de anticorpo monoclonal anti-ICOS evita a rejeição aguda e aumenta a sobrevida do aloenxerto. O uso de anti-ICOS e a análise de citocinas em camundongos que não apresentavam gene para a produção de ICOS foram associados com supressão da resposta imune ao aloenxerto medidas através da expressão de citocinas e ativação linfocitária. A combinação anti-ICOS com ciclosporina gerou funcionamento permante dos enxertos. O bloqueio de ICOS-ICOSL foi também responsável pela ausência de alterações histológicas. O estímulo da via co-estimulatória ICOS-ICOSL demonstrou ser fundamental para o desenvolvimento de rejeição crônica após o bloqueio das via CD40-CD40L com anti-CD40L. Os autores concluíram que esta via exerce papel fundamental na resposta imune aguda e crônica ao aloenxerto e que apresenta potencial para ser explorada com objetivos terapêuticos, principalmente na associação com ciclosporina ⁷⁶.

SHIRAIISHI, YASUNAMI, TAKEHARA, UEDE, KAWAHARA e SHIRASUKA (2002) realizaram estudo com o intuito de verificar se administração de CTLA4-Ig aumentaria a sobrevida de roedores submetidos a transplante de pulmão. Ratos Brown-Norway foram utilizados como doadores e ACI como receptores. CTLA-4-Ig foi administrada em dose única um dia após a realização dos transplantes. Os resultados demonstraram que animais tratados com CTLA-4-Ig, mesmo quando

utilizada em baixas doses aumentou a sobrevida do aloenxerto (média maior que 90 dias) em relação a animais não tratados (média de 7 dias). Metade dos animais que tiveram sobrevida do enxerto maior que 90 dias receberam um transplante de pele de doadores da mesma espécie que o prévio transplante de pulmão e demonstraram ausência de rejeição aguda. Os autores concluíram que CTLA-4-Ig pode prevenir episódios de rejeição aguda e induzir tolerância imunológica neste modelo experimental de transplante de pulmão ¹⁰⁵.

NATHAN, YIN, EICHWALD e BISHOP (2002) realizaram estudo para testar se o bloqueio da via CD40-CD40L estava relacionado à deleção de APCs do doador. Utilizaram modelo de transplante cardíaco com camundogos BALB/c como doadores e C57BL/6 como receptores. O anticorpo monoclonal anti-CD40L foi utilizado em 3-7 doses nos primeiros 10 dias após o transplante. Os resultados demonstraram que anti-CD40L foi capaz de aumentar a sobrevida do aloenxerto. Evitou rejeição aguda através da inibição da ação da IL-2 (sobre linfócitos T CD4⁺), do IFN- γ e da produção de anticorpos específicos sem a deleção de APCs do doador. Transferência de esplenócitos de animais tratados com anti-CD40L foi capaz de evitar a rejeição aguda dos corações, porém não evitaram a rejeição de transplante de pele. Além disto, anti-CD40L foi associado com atraso no desenvolvimento de sinais de rejeição crônica. Os autores concluíram que o bloqueio da via CD40-CD40L está associado com mecanismos imunorregulatórios diversos que não causam depleção linfocitária, mas induzem hiporresponsividade ao aloenxerto ⁷¹.

2.3.3 Imunomodulação do Sinal 1 e Anti-CD45

SHAPIRO & LIU (1995) estudaram os efeitos imunológicos da incubação de ilhotas de Langerhans *in vitro* isoladas de camundongos B10.BR com o anticorpo monoclonal anti-CD45. Quatrocentas ilhotas foram transplantadas abaixo da cápsula renal do rim esquerdo de camundongos B10.D2 diabéticos pela administração de estreptozotocina. No pré-operatório imediato, as ilhotas foram incubadas em solução

salina de Hanks a 4°C, durante 50 minutos, contendo 10 µg do anticorpo monoclonal anti-CD45. Na avaliação pós-operatória a glicemia desses animais permaneceu normal durante 61,3±36,7 dias, apresentando significativa diferença em relação ao grupo controle (31,8±24,3 dias). Animais que apresentaram aumento da sobrevida do aloenxerto e foram injetados com esplenócitos dos doadores rejeitaram o enxerto. A ação do anticorpo não ocorreu devido à depleção de células expressando a molécula CD45. A avaliação das ilhotas por citometria de fluxo mostrou diminuição não-significativa da expressão de CD45 quando incubadas com o anticorpo em relação àquelas não-incubadas. Os autores concluíram que anti-CD45 age inibindo o sinal co-estimulatório durante a apresentação do aloantígeno ¹⁰³.

LAZAROVITS, POPPEMA, ZHANG, KHANDAKER, LE FEUVRE, SINGHAL, GARCIA, OGASA, JEVNIKAR, WHITE, SINGH, STILLER e ZHONG (1996) investigaram se o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB23G2) pode prevenir rejeição do enxerto renal em um modelo murino. Camundongos C57BL/6 foram usados como doadores e BALB/c como receptores. Anti-CD45 foi administrado um dia antes e no dia do transplante. Os resultados demonstraram que os animais tratados com anti-CD45 tiveram função renal normal e presença de tolerância imunológica. O uso de anti-CD45 também foi associado com reversão de episódios de rejeição aguda em animais que não usaram imunossupressão. Os autores concluíram que anti-CD45 produz imunossupressão, e que pode ter aplicação clínica para prevenir e tratar rejeição aguda em humanos ⁵⁵.

AUERSVALD, ROTHSTEIN, OLIVEIRA, KHUONG e BASADONNA (1997) verificaram se o anticorpo monoclonal anti-CD45RB era capaz de induzir aumento da sobrevida do aloenxerto em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans. Camundongos C57BL/6 diabéticos receberam enxerto de ilhotas de Langerhans, posicionado abaixo da cápsula renal, oriundas de camundongos BALB/c. Entre os diversos regimes de administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB23G2) usados, verificou-se que quando adotada uma dose de 100 µg via endovenosa aplicada 1 dia antes da cirurgia, no pré-operatório imediato e no 5º dia de

pós-operatório, 60% dos animais apresentaram-se normoglicêmicos por um período maior que 100 dias; sendo que os animais do grupo controle rejeitaram o enxerto na segunda semana de pós-operatório. Quando se utilizou o anticorpo monoclonal anti-CD45RB C363.16A proveniente de outro hibridoma, no mesmo regime de administração, os camundongos também apresentaram significativo aumento da sobrevida do enxerto em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que anticorpos monoclonais anti-CD45 são potentes imunomoduladores da resposta imune ao aloenxerto, capazes de aumentar significativamente a sobrevida do enxerto sem uso de drogas imunossupressoras ⁷.

BASADONNA, AUERSVALD, KHUONG, ZHENG, KASHIO, ZEKZER, MINOZZO, QIAN, VISSER, DIEPSTRA, LAZAROVITS, POPPEMA, STROM e ROTHSTEIN (1998) realizaram estudo experimental para verificar se o anticorpo monoclonal anti-CD45RB era capaz de induzir tolerância imunológica em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans. Camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina foram submetidos a enxerto de ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c posicionado abaixo da cápsula renal. Os receptores foram tratados com 100 µg via endovenosa do anticorpo MB23G2 (anti-CD45RB) 1 dia antes da cirurgia, no pré-operatório imediato e no 5º dia de pós-operatório. Dos 14 animais tratados, 7 permaneceram euglicêmicos até o 120º dia de pós-operatório, quando então foram nefrectomizados, do que resultou o retorno da glicemia para os mesmos níveis do pré-operatório. Desses 7 animais, 4 foram submetidos a novo transplante de ilhotas no rim contralateral, usando-se novamente como doadores camundongos BALB/c, sendo que 3 deles permaneceram euglicêmicos até o 50º dia de pós-operatório. Os outros 3 animais foram submetidos a transplante de ilhotas proveniente de outra espécie de camundongos, apresentando rejeição no 10º dia de pós-operatório. Anti-CD45 induziu diminuição temporária no número de leucócitos circulantes, mas não afetou o número de leucócitos em outros órgãos do tecido linfóide. Análise histológica dos enxertos na segunda semana de pós-operatório demonstrou que nos animais tratados com MB23G2 houve substancial

diminuição da infiltração linfocitária na região ao redor das ilhotas de Langerhans, sem inflamação e com manutenção da anatomia das ilhotas de Langerhans em relação a animais que não foram tratados. O uso de MB23G2 originou uma alteração na expressão das formas de CD45, com diminuição da forma CD45RB^{High} e aumento considerativo da forma CD45RB^{Low}. Esta alteração das formas de CD45 também foi associada com um aumento na expressão do RNA de IL-4 e 10 no enxerto de animais tratados com MB23G2. Os autores concluíram que anti-CD45RB (MB23G2) pode induzir tolerância imunológica através de um mecanismo imunomodulatório distinto e único, que pode apresentar aplicabilidade direta em transplante em humanos ¹¹.

FREITAS (2000) realizou estudo experimental com o objetivo de avaliar a modulação do sistema imune através do uso do anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB23G2) administradas no período peritransplante (dias -1, 0 e 5) em um modelo de aloenxerto de ilhotas de Langerhans em roedores. Camundongos BALB/c serviram como doadores, e C57BL/6 diabéticos por estreptozocina receberam enxertos sob a cápsula do rim esquerdo. Os aloenxertos dos grupos controle (não-tratados) e dos animais que foram tratados somente com anti-CTLA-4 apresentaram rejeição entre o 10° e o 15° dia. Enxertos do grupo tratado com anti-CD45RB funcionaram até o 120° dia quando foram submetidos a um 2° transplante. Animais que receberam um 2° enxerto de camundongos BALB/c não apresentaram rejeição até o 50° dia (em 75% dos transplantes) e os que receberam um 2° enxerto de camundongos CBA/H apresentaram rejeição entre o 10° e o 15° dia. O uso de anti-CTLA-4 causou rejeição entre o 15° e o 25° dia de pós-operatório em todos os animais previamente tratados com anti-CD45RB. Análise por citometria de fluxo mostrou aumento do número de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RB^{Low} e com um aumento de CTLA-4 intracelular e diminuição no número de linfócitos T CD4⁺ apresentando CD45RB^{High} nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB em relação ao grupo controle. O autor concluiu que o predomínio de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RB^{Low} e CTLA-4 intracelular, que é regulador negativo da ativação linfocitária, está associado ao aumento da sobrevida dos enxertos e à indução de tolerância

imunológica nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB²⁹.

KO, JAGER, TSUI, DEIWICK, DINKEL, ROHDE, DAHLKE, LAUTH, WONIGEIT e SCHLITT (2001) realizaram estudo experimental para verificar se o anticorpo monoclonal anti-CD45 (RT7) poderia aumentar a sobrevida do enxerto em modelos de transplante cardíaco e de pele em roedores. Ratos LEW foram utilizados como doadores e LEW.1W como receptores. Dose única de anti-CD45 (RT7) foi administrada um dia antes do procedimento cirúrgico. Os resultados demonstraram que anti-RT7 é capaz de ligar-se com todas as linhagens hematopoéticas, mas particularmente com linfócitos T e NK, ocorrendo profunda depleção destas subpopulações na circulação periférica e em órgãos linfóides logo após a utilização do antígeno. Ratos que receberam tratamento com anti-RT7 apresentaram aumento da sobrevida do enxerto cardíaco (maior que 200 dias) em relação a animais não tratados. Animais que receberam tratamento apresentaram aumento discreto da sobrevida do enxerto de pele. Aqueles que apresentaram longa sobrevida do enxerto cardíaco apresentaram proliferação linfocitária em resposta ao aloantígeno normal *in vitro* e também rejeitaram agudamente transplantes de pele secundários de doadores da mesma espécie que os aloenxertos cardíacos, indicando ausência de tolerância imunológica. Análise das citocinas presentes nos enxertos dos animais tratados com anti-CD45 apresentaram um aumento do RNAm de FAS-ligand e IL-4. Os autores concluíram que dose única de anti-CD45 induz um aumento na sobrevida de aloenxertos cardíacos, através de um mecanismo de depleção linfocitária⁴⁸.

FECTEAU, BASADONNA, FREITAS, ARIYAN, SAYEGH e ROTHSTEIN (2001) realizaram estudo experimental para investigar o papel da molécula CTLA-4 no aumento da sobrevida do enxerto em um modelo murino de transplante de ilhotas de Langerhans tratado com anti-CD45RB. Camundongos C57BL/6 diabéticos receberam enxertos provenientes de camundongos BALB/c posicionados abaixo da cápsula renal. Os receptores foram tratados com 100 µg via endovenosa do anticorpo MB23G2 (anti-CD45RB) um dia antes da cirurgia, no pré-operatório imediato e no 5º dia de pós-operatório. Os resultados demonstraram que,

para que ocorra o aumento da sobrevida do aloenxerto mediada por anti-CD45 a presença de CTLA-4 é necessária. Animais tratados com anti-CD45 apresentaram o dobro da expressão de CTLA-4 nos linfócitos T CD4⁺. Também foi demonstrado que anti-CD45 não aumenta a ativação linfocitária, sugerindo que a maior expressão de CTLA-4 deve-se a um mecanismo único de imunomodulação. A administração simultânea de anti-CTLA-4 e anti-CD45RB não alterou a expressão das formas de CD45, porém bloqueou seu efeito modulador, já que animais tratados somente com anti-CD45 apresentaram 50% de sobrevida do aloenxerto, enquanto que animais que receberam anti-CTLA-4 concomitantemente com anti-CD45RB obtiveram sobrevida do aloenxerto de somente 22 dias. Os autores concluíram que anti-CD45 age aumentando a expressividade da molécula CTLA-4 nos linfócitos CD4⁺. De maior importância, anti-CD45 apresenta esta capacidade sem apresentar ativação linfocitária simultânea, o que pode representar um mecanismo único para a geração de tolerância imunológica²⁷.

KINGSLEY, HARA, NIIMI, READ, TURVEY, BUSHELL, MORRIS, POWRIE e KOOD (2002) realizaram estudo experimental para verificar se o uso do anticorpo monoclonal anti-CD4 é capaz de induzir a presença de linfócitos T regulatórios com o fenótipo CD25⁺CD4⁺ em um modelo de transplante de pele em camundongos. Os doadores foram camundongos B.10 e os receptores foram camundongos imunodeficientes CBA. Receptores receberam esplenócitos do doador e também anticorpo monoclonal anti-CD4 antes do transplante. Os resultados demonstraram que pré-tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD4 e exposição a células do doador é capaz de gerar a subpopulação linfocitária CD25⁺CD4⁺. Estes linfócitos são capazes de suprimir a rejeição aguda ao aloenxerto. Os resultados ainda demonstraram que esta supressão só é estabelecida na presença desta subpopulação linfocitária específica, já que as demais populações linfocitárias testadas foram incapazes de abolir rejeição gerada por linfócitos CD45RB^{High}. Foi também demonstrado que o bloqueio da IL-10 e de CTLA-4 incapacita esta subpopulação linfocitária de exercer sua função imunorreguladora. Os autores concluíram que a

geração de linfócitos T reguladores através do uso de anticorpos monoclonais pode gerar um controle dinâmico do fenômeno de rejeição ao aloenxerto, possibilitando que o enxerto funcione infinitamente sem o uso de drogas imunossupressoras ⁴⁵.

2.3.4 Imunomodulação Através da Combinação de Anticorpos Monoclonais

RASTELLINI, SALAM, KUDDUS, AITOUICHE, SUBBOTIN, BRAUN, LEACH, PEACH, FUNG, STARZL e RAO (1999) avaliaram o efeito da combinação do anticorpo monoclonal anti-CD40L e de CTLA-4-Ig na indução de tolerância imunológica em um modelo murino de transplante de ilhotas de Langerhans. Utilizaram camundongos DBA/2 como doadores, e os aloenxertos foram posicionados abaixo da cápsula renal de camundongos C3H diabéticos pela administração de estreptozotocina. Os animais que não receberam tratamento ou receberam somente o anticorpo anti-CD40L apresentaram rejeição em uma média de 19 dias de pós-operatório; 5 animais que haviam recebido a imunoglobulina CTLA-4 apresentaram rejeição entre o 8° e o 26° dia de pós-operatório e 2 (29%) apresentaram sobrevida do enxerto de 54 e 56 dias. Os 9 animais submetidos à combinação das duas terapias apresentaram-se normoglicêmicos durante 81 a 180 dias de pós-operatório. Esses animais, submetidos a enxerto de pele proveniente da mesma linhagem dos doadores de ilhotas, apresentaram tolerância e, nos casos de tecido de linhagem diferente, apresentaram rejeição. Os autores concluíram que a associação de anti-CD40L e CTLA-4-Ig pode aumentar a sobrevida do aloenxerto neste modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans ⁸¹.

ROTHSTEIN, LIVAK, KISHIMOTO, ARIYAN, QIAN, FECTEAU, SHO, DENG, ZHENG, SAYEGH e BASADONNA (2001) realizaram estudo experimental para verificar se a combinação de bloqueio dos sinais 1 e 2 aumentaria a sobrevida do aloenxerto. Realizaram transplante de pele e de ilhotas de Langerhans de camundongos BALB/c para camundongos C57BL/6. Para o bloqueio do sinal 1, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB23G2), e para o bloqueio do sinal

2 foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD40L, ambos em 3 doses no período peri-operatório. Os resultados demonstraram que a terapia combinada aumentou a sobrevida do aloenxerto no modelo de transplante de ilhotas de Langerhans, com 83% dos receptores permanecendo normoglicêmicos por mais de 4 meses. Ao mesmo tempo a terapia combinada foi capaz de induzir tolerância imunológica e aumentar a sobrevida de enxertos de pele. Análise histológica demonstrou que a combinação diminuiu a inflamação ao redor das ilhotas de Langerhans transplantadas, inibiu a produção de IL-2 e IFN- γ e aumentou a produção de IL-4 e 10. Os autores concluíram que a combinação dos bloqueios dos sinais 1 e 2 aumenta a sobrevida do aloenxerto ⁹⁰.

2.3.5 Importância da Exposição ao Antígeno do Doador no Uso de Anticorpos Monoclonais para a Indução de Tolerância Imunológica

OPELZ & TERASAKI (1974) reconheceram que transfusões sangüíneas antes do transplante renal melhorava a sobrevida do enxerto e acreditavam que isto se devia a indução de um estado imune de não-responsividade ⁷⁵. Diversos estudos vem sendo realizados com o intuito de descobrir os mecanismos relacionados à doação específica do antígeno (DST). Mais recentemente, diversos protocolos vem utilizando o contato ao antígeno do doador previamente ao transplante para que se melhore a sobrevida do enxerto ou se adquira tolerância imunológica ⁹¹.

PARKER, GREINER, PHILLIPS, APPEL, STEELE, DURIE, NOELLE, MORDES e ROSSINI (1995) realizaram estudo experimental em camundongos para verificar o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD40L (duas vezes por semana, por 2 a 7 semanas), associado ou não a injeção endovenosa de linfócitos B dos doadores na indução de tolerância imunológica. Utilizaram um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos BALB/c como doadores e C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozotocina. Os animais que receberam somente linfócitos ou não tinham recebido tratamento (grupo controle) apresentaram sobrevida dos enxertos de 15 \pm 5 dias. Os que receberam somente o anticorpo anti-CD40L, 24 \pm 30 dias. No grupo dos

animais que receberam a combinação de anticorpo com linfócitos, 96% apresentaram sobrevida infinita do aloenxerto. Os autores concluíram que anti-CD40L pode prevenir a indução do sinal co-estimulatório (sinal 2) quando combinados com a exposição a linfócitos do doador em enxertos de ilhotas de Langerhans⁷⁷.

ROSSINI, PARKER, PHILLIPS, DURIE, NOELLE, MORDES e GREINER (1996) testaram se o anticorpo monoclonal anti-CD40L era capaz de induzir um aumento da sobrevida dos enxertos em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans. Camundongos FVB foram utilizados como doadores, e os enxertos foram posicionados abaixo da cápsula renal de camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozotocina. Os receptores receberam 250 µg do anticorpo monoclonal anti-CD40L, via intraperitoneal, duas vezes por semana, durante 7 semanas (iniciando-se 8 dias antes do transplante), em combinação ou não com a injeção endovenosa pré-transplante de esplenócitos depletados de linfócitos T provenientes dos doadores. Os enxertos no grupo controle, sem tratamento, funcionaram em média 11 dias. No grupo que recebeu somente o anticorpo anti-CD40L, 20% dos animais atingiram 85 dias de pós-operatório sem rejeição, o que também ocorreu com 100% dos animais no grupo que recebeu a combinação do anticorpo com os esplenócitos. Os autores concluíram que o bloqueio do sinal co-estimulatório nos linfócitos T com o anticorpo anti-CD40L foi o responsável pelo aumento da sobrevida dos enxertos. Este efeito foi exacerbado pelo grande número de APCs transplantados (esplenócitos depletados de linfócitos T), também impossibilitados de fornecer o sinal co-estimulatório, fornecendo somente o sinal 1⁸⁷.

ONODERA, CHANDRAKER, SCHAUB, STADLBAUER, KOROM, PEACH, LINSLEY, SAYEGH e KUPIEC-WEGLINSKI (1997) testaram se o bloqueio da via CD28-B7 através do uso de CTLA4-Ig e de transfusão de antígenos do doador (DST) era capaz de abolir a rejeição hiperaguda em um modelo murino de transplante cardíaco. Utilizaram ratos LBNF1 como doadores, e ratos LEWIS como receptores. Os receptores também receberam um transplante de pele de ratos LBNF1 (ou Brown-Norway como controles) uma semana antes do transplante cardíaco para a pré-sensitização do

receptor aos antígenos do doador e indução de rejeição aguda. Os resultados demonstraram que o uso de CTLA4-Ig diminui discretamente a indução de rejeição hiperaguda. Porém, se a infusão de CTLA4-Ig e de aloantígenos for realizada logo após o transplante cardíaco (fase efetora) um significativo prolongamento na sobrevida do enxerto e aquisição de tolerância imunológica foi observada em 30-50% dos receptores. Os autores concluíram que o bloqueio do sinal co-estimulatório da via CD28-B7 é fundamental para indução de rejeição hiperaguda do enxerto. O uso precoce de CTLA4-Ig combinada com a transfusão de esplenócitos durante o período per-operatório interrompe a sensibilização e é capaz de gerar tolerância imunológica ⁷⁴.

ZHENG, LI, LI, ROY-CHAUDHURY, NICKERSON, TIAN, SAYEGH e STROM (1999) estudaram o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD40L em induzir tolerância imunológica em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans usando camundongos DBA/2 como doadores em camundongos B6AF1 diabéticos como receptores. Os animais do grupo controle, sem tratamento, tiveram sobrevida média do enxerto de 15 dias. Os animais tratados com o anticorpo anti-CD40L, 36 dias. Aqueles tratados 28 dias antes do transplante com anti-CD40L associado a imunização prévia com sangue de camundongos da mesma espécie do doador, tiveram sobrevida infinita do enxerto. E os animais somente sensibilizados 28 dias antes do procedimento apresentaram aceleração do processo de rejeição. Sete dos animais com sobrevida indefinida do enxerto foram submetidos a nefrectomia e remoção do enxerto no 150º dia de pós-operatório apresentando hiperglicemia pós-operatória. Destes 7 animais, 4 toleraram um segundo transplante com doadores da mesma espécie sem imunossupressão e 3 rejeitaram o segundo transplante de ilhotas provenientes de camundongos C3H. Ainda nesse mesmo grupo de 7 animais, 4 semanas após o transplante de ilhotas, 4 animais receberam enxerto cardíaco heterotópico proveniente de camundongos DBA/2 e não apresentaram rejeição. Os autores concluíram que ocorre desenvolvimento de tolerância imunológica não somente ao tecido endócrino pancreático, mas também a outros órgãos após o bloqueio do sinal co-estimulatório entre CD40-CD40L através do uso do anticorpo monoclonal anti-CD40L ¹²⁴.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As normas técnicas utilizadas neste trabalho seguiram as orientações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) de 2000 e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná de 2001^{1,116}. Utilizou-se a *Nomina Anatomica Veterinária* de 1994³⁵. Todos os experimentos foram realizados nos Departamentos de Cirurgia e Medicina Interna da Yale University (New Haven, CT, EUA) no período de maio de 2000 a julho de 2002.

3.1 PROTOCOLOS E ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos BALB/c (H-2^d), C57BL/6b (H-2^b) e DBA/1(H-2^k) obtidos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA) com 6-8 semanas de vida. Todos os animais foram submetidos a um período de aclimação de 1-2 semanas no biotério da Yale University. Animais não-submetidos a transplante foram utilizados somente para análise do fenótipo dos linfócitos por citometria de fluxo.

Nos camundongos que receberam anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi utilizado acesso retrorbital (olho esquerdo). Tratamento "Standard" foi definido como injeções deste anticorpo na dose de 100µg (em 0,1 ml de PBS a 1%) nos dias -1, 0 e 5. Dia zero foi considerado como o dia que o animal recebeu o enxerto.

Mesmo nos grupos de animais que não foram submetidos a transplante, o mesmo esquema de dosagem foi utilizado para que se definisse a cinética linfocitária. Para fins de estudo, nestes grupos o dia da primeira dose de anti-CD45RB foi considerado dia -1.

Em alguns grupos, o transplante foi realizado dias depois das injeções do anticorpo monoclonal (tabela 4). Nos camundongos que foram submetidos a timectomia, este procedimento foi realizado no dia -7, após a constatação que os animais tornaram-se diabéticos. Exposição ao aloantígeno foi realizada no dia zero.

Novas dosagens do anticorpo foram realizadas através da injeção de dose única intraperitoneal de 100µg de anti-CD45RB a cada 15 dias até o final do experimento.

As tabelas 3 e 4 resumem os diversos grupos utilizados para que se entendesse inicialmente a cinética das células $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ e do timo após o uso de anti-CD45RB (animais não submetidos a transplante-tabela 3) e posteriormente dos diversos grupos de camundongos que foram transplantados para que se entendesse como este antígeno do doador no mecanismo de ação deste anticorpo monoclonal poderia ter sua posologia modificada e qual era a importância das células $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ e da exposição ao antígeno do doador no mecanismo de anti-CD45RB (tabela 4).

O presente estudo obteve aprovação do Comitê Institucional de Cuidados e Uso dos Animais (IACUC) da Yale University. Foi registrado sob número 10406/2001 e seguiu as diretrizes propostas para o cuidado de animais vertebrados usados em pesquisa proposto pelo governo americano⁸⁰.

3.2 ANESTESIA E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Em todos os experimentos conduzidos neste trabalho, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xylestesina (KET/XYL), descrito em reagentes (anexo), na dose de 0,05 ml por camundongo, injetado intramuscular na coxa esquerda dos animais cinco minutos antes da realização de cada experimento.

Os animais que foram utilizados para experimento de fenotipagem dos esplenócitos e como doadores de ilhotas de Langerhans foram submetidos a eutanásia através de deslocamento manual da coluna cervical, sob anestesia. Animais que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos (timectomias e/ou receptores de transplante de ilhotas de Langerhans) foram submetidos a eutanásia por inalação de CO₂ em câmara de gás, após a constatação de não funcionamento primário do enxerto (hiperglicemia, ver seção 3.4.3.10) ou após o acompanhamento pós-operatório de 120 dias⁵.

3.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T CD4⁺

Foram avaliados os esplenócitos dos camundongos BALB/c não submetidos ao enxerto. Os animais foram divididos em grupos conforme mostra a Tabela 3 . As injeções endovenosas do anticorpo monoclonal anti-CD45RB foram administradas inicialmente conforme descrito em 3.1 e posteriormente com adição de novas doses ao protocolo original.

TABELA 3 – GRUPOS DE ANIMAIS NÃO SUBMETIDOS A TRANSPLANTE

GRUPO	N	REGIME TERAPÊUTICO
I	10	Sem tratamento
II	34	100µg ev de anti-CD45RB dias -1,0 e 5
III	15	100µg ev de anti-CD45RB dias -1,0 e 5 + 100µg ip de anti-CD45RB Q15
IV	10	Timectomia dia -7
V	34	Timectomia dia -7 + 100µg ev de anti-CD45RB dias -1,0 e 5

n – número de camundongos, ev – via endovenosa, ip- intraperitoneal, Q15 - a cada 15 dias

Animais de diferentes grupos foram avaliados por imunofluorescência direta e citometria de fluxo para expressão de CD4 de superfície, CD45RB de superfície, e CTLA-4 intracelular. IgG de hamster anti-humano-PE foi usada como controle para a especificidade da fluorescência de CTLA-4 intracelular. IgG de rato-FITC foi usada como controle na avaliação da expressão de CD45RB de superfície. IgG de rato-Cy foi usada como controle na avaliação da expressão de CD4 de superfície.

Para que se fosse determinado a quantidade de CTLA-4 intracelular e forma de CD45RB nos linfócitos CD4⁺ após diferentes dias de tratamento, foi utilizado um modelo experimental de fenotipagem seriada dos esplenócitos. Análises diárias do fenótipo dos linfócitos CD4⁺ foram realizadas, sacrificando-se os camundongos e estudando o fenótipo dos esplenócitos Análise foi iniciada um dia após a última dose

de anti-CD45RB (dia 6) e terminada no dia em que a expressão das formas de CD45 e de CTLA-4 retornavam ao nível basal (pré-tratamento). Para que os dados pudessem ser confirmados, linfonodos periféricos foram avaliados posteriormente. Análises seriadas no mesmo camundongo também foram conduzidas, verificando-se o fenótipo dos linfócitos presentes no sangue periférico dos mesmos animais em diferentes dias.

A seguir, foi avaliado a cinética dos linfócitos CD4 dos animais dos grupos submetidos à timectomia antes do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Utilizou-se, para isso, o mesmo modelo experimental de fenotipagem seriada dos esplenócitos descrito acima.

3.3.1 Isolamento de Esplenócitos e de Soro dos Camundongos

Nos experimentos em que se utilizaram soro de camundongo para a análise de anticorpo residual na circulação periférica, os camungos foram anestesiados conforme descrito em 3.2. Então, 1 ml de sangue periférico foi retirado do plexo retro-orbital com o auxílio de flebotomos de vidro (Fisher Scientific, Springfield, NJ, EUA) previamente heparinizados antes da eutanásia e exérese do baço. O sangue foi então coletado em frascos de Eppendorf (USA Scientific, Waltham, MA, EUA) de polipropileno de 1,5 ml e centrifugado a 1200 rotações por minuto durante 3 minutos. Seguiu-se a coleta da metade superior do centrifugado (soro) para realização dos experimentos. Analisaram-se os esplenócitos de 3-12 animais por grupo em cada experimento, em um mínimo de três experimentos independentes. Após anestesia e eutanásia, seguiu-se abertura da cavidade abdominal através de incisão subcostal esquerda, secção do pedículo esplênico e retirada do baço. O baço foi colocado em uma placa de Petri de 100 x 15 mm (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ, EUA) contendo PBS a 1%. Cerca de 1 ml de PBS a 1% foi injetado no interior do órgão através de uma agulha de 27½G (Becton Dickinson). O baço foi macerado gentilmente, com o êmbolo da seringa, para retirada dos esplenócitos do interior da cápsula do órgão para o interior da placa de Petri. A solução de PBS a 1% contendo os

esplenócitos foi aspirada, evitando-se os pequenos fragmentos da cápsula; colocada em um tubo de polietileno cônico de 15 ml (Falcon[®], Becton Dickinson) e centrifugada a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, foi realizada a lise hipotônica das hemácias do precipitado adicionando-se solução para lise dos eritrócitos (5 ml por baço). A reação foi interrompida após 5 minutos com a adição de 10 ml de PBS a 1% gelado. A solução foi misturada e centrifugada a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 5 ml de PBS 1% foram adicionados. A contagem das células foi realizada com um hemocítômetro (Hausser Scientific, Chicago, IL, EUA) em microscópio óptico Nikon (Melville, New York, EUA) modelo TMS-F, com aumento de 100 vezes. As células viáveis apresentavam intenso brilho, em contraste com as células mortas, que se apresentavam opacas ou escurecidas quando analisadas pelo corante azul de Trypan.

3.3.2 Imunofluorescência Direta

Colocaram-se 1 milhão de esplenócitos viáveis diluídos na solução de PBS 1% em diferentes tubos de ensaio de vidro de 4,5 ml (Becton Dickinson) que eram previamente identificados com o nome do grupo, número do animal e anticorpo a ser adicionado.

Os tubos foram centrifugados a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, deixando-se somente o precipitado contendo os esplenócitos.

Foram adicionados ao precipitado 100 µl de PBS 1% contendo 5% de soro bovino e 1 µl de cada anticorpo contendo fluoresceína (descritos em 3.1), de acordo com que cada tubo havia sido pré-identificado. Os tubos foram incubados a 4°C em sala escura durante 20 minutos. Seguiu-se lavagem das células com PBS a 1%, a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado dos tubos foi fixado com 400 µl de formaldeído a 2%. Os tubos que continham

esplenócitos que estavam sendo avaliados somente para receptores de superfície (CD4 e CD45RB, e seus controles negativos) eram considerados prontos para a avaliação por citometria de fluxo e armazenados em câmara escura a 4°C até que a análise por citometria de fluxo fosse realizada.

Após 20 minutos da adição de formaldeído, células dos tubos que estavam sendo avaliados para conteúdo total intracelular (CTLA-4 e seu controle negativo), eram lavadas com PBS a 1%, a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. A seguir, eles foram incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente, com 1 ml de saponina a 0,5% em cada tubo, para que se realizasse imunofluorescência intracelular. Na seqüência, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 1.000 rotações por minuto, desprezando-se o sobrenadante. Ao precipitado destes tubos foram adicionados 100 µl de PBS 1% com 5% de soro bovino e 1µl do anticorpo monoclonal anti-CTLA-4-PE a 0,2 mg/ml, ou 1µl de IgG de hamster a 0,2 mg/ml aos tubos considerados controle negativos. Os tubos foram incubados na temperatura ambiente durante a primeira hora. Após, foram submetidos a 2 ciclos de lavagem com PBS a 1% e centrifugação a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos e, em seguida, ao primeiro ciclo de lavagem e centrifugação com 2 ml de PBS 1%. Por fim, foram adicionados a cada tubo 400 µl de PBS a 1% e os mesmos eram estocados para realização da citometria de fluxo.

3.3.3 Citometria de Fluxo

Os tubos foram avaliados no citômetro de fluxo “FACScalibur” (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA). Analisou-se 50-100 mil células por tubo em cada experimento.

Para a regulagem do citômetro de fluxo, tubos contendo somente esplenócitos sem a presença de anticorpos eram usados para a determinação do tamanho (FSC-H) e granularidade das células (SSC-H). A seguir, mediu-se a fluorescência dos esplenócitos para IgG de rato anticamundongo-FITC (FL1-H) e para

IgG de hamster anticamundongo-PE (FL2-H). Em seguida, mediu-se a fluorescência de IgG de hamster anticamundongo-PE (FL2-H) e IgG de rato anticamundongo-Cy-chrome (FL3-H). Como nesses tubos não há anticorpos, eles são usados para determinação das células que não expressam os anticorpos usados na avaliação (controles isotípicos negativos).

Mediu-se então a fluorescência dos linfócitos para os marcadores em estudo, adicionados a tubos diferentes e considerados como controles positivos: CD45RB-FITC (FL1-H); CTLA-4-PE (FL2-H); e CD4-Cy (FL3-H). Realizou-se a compensação de leitura do *laser* do citômetro de fluxo entre os diferentes espectros de absorbância da fluorescência utilizadas no diferentes canais, através da regulação da amperagem. Fixou-se linhas para determinação dos quadrantes que dividiam estas populações. Assim, a linha vertical e a horizontal formaram os quadrantes que forneceram os resultados da avaliação por citometria nos tubos contendo os anticorpos em estudo em cada experimento.

3.3.4 Análise dos Dados de Citometria de Fluxo

Os dados obtidos pela citometria foram analisados pelo programa “Cell Quest[®]” (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Inicialmente avaliou-se a população geral de células presentes nos tubos (controles negativos e positivos). A seguir, as células foram selecionados de acordo com tamanho e granularidade, identificando-se somente a população de linfócitos e separando-a das outras células através de um portal. Então, avaliou-se o fenótipo dos linfócitos contidos no portal baseado na fluorescência do anticorpo utilizado.

Dividiu-se células expressando CD45RB de alto ($CD45RB^{High}$) e de baixo peso molecular ($CD45RB^{Low}$) baseado no histograma obtido para os linfócitos do canal FL1-H. A quantidade de células $CD45RB^{Low}$ e $CD45RB^{High}$ foi expressa em porcentagem do total de células CD4-Cy positivas.

3.3.5 Análise de Anticorpo Residual na Superfície Linfocitária e no Soro

A avaliação da presença do anticorpo monoclonal anti-CD45RB residual na superfície dos linfócitos T CD4⁺ foi realizada com um anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC. Após tratamento de camundongos com anti-CD45, isolamento de esplenócitos foi realizado seriadamente (conforme descrito em 3.3.1). Determinou-se que os mesmos ainda continham resíduo de anticorpo anti-rato na superfície da membrana citoplasmática, através da utilização de imunofluorescência indireta e análise por citometria de fluxo (descrito em 3.3.2-3.3.4). Para que se verificasse a presença do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 na circulação periférica durante estes mesmos experimentos, esplenócitos foram também incubados inicialmente com soro de camundongos previamente tratados com anti-CD45RB (conforme descrito em 3.3.1) e, em seguida, com o anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC, seguido pela utilização de imunofluorescência indireta e análise por citometria de fluxo (descrito em 3.3.2 - 3.3.4). Foram utilizados 8 camundongos BALB/c em 3 experimentos independentes para a confirmação dos resultados.

3.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.4.1 Animais Submetidos a Transplante de Ilhotas de Langerhans

Os doadores de ilhotas de Langerhans foram camundongos BALB/c. Os receptores das mesmas foram camundongos C57BL/6b. A divisão dos animais que foram submetidos a alotransplante (receptores) de ilhotas de Langerhans em diferentes grupos está demonstrada na Tabela 4.

TABELA 4 – GRUPOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

GRUPO	n	REGIME TERAPÊUTICO
VI	5	Sem tratamento
VII	7	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5
VIII	12	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 + 100 µg ip anti-CD45RB Q15
IX	5	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 + 100 µg ip dia 18 Transplantes realizados no dia 19
X	5	Timectomia dia -7
XI	10	Timectomia dia -7 + 100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5
XII	6	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 Transplantes realizados no dia 7
XIII	10	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 Transplantes realizados no dia 10
XIV	6	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 Transplantes realizados no dia 18
XV	6	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 + exposição ao aloantígeno do doador no dia zero Transplantes realizados no dia 10
XVI	6	100 µg ev anti-CD45RB nos dias -1,0 e 5 + exposição ao aloantígeno diferente do doador no dia zero Transplantes realizados no dia 10

n – número de camundongos utilizados por grupo, ev - via endovenosa, ip - via intraperitoneal, Q15 - a cada 15 dias após dia zero até o final do experimento, n- número de animais

3.4.2 Indução de Diabetes Química

Diabetes química foi induzida através de injeção única intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma Corporation) em uma dose de 200 mg/kg diluída em 0,5 ml de solução salina isotônica 10-15 dias antes da realização do alotransplante. Após 7 dias, a glicemia foi verificada com um glucômetro portátil (Bayer Corporation, Elkhart, IN,

EUA). A coleta das amostras sanguíneas foi realizada por secção da porção distal da cauda dos animais. Foram selecionados como receptores somente os animais com glicemia superior a 350 mg/dl. Hiperglicemia foi confirmada novamente no dia anterior ao transplante. Animais não transplantados até 7 dias após a constatação inicial dos níveis hiperglicêmicos recebiam insulina regular (Lente[®], Elli Lilly Company, Indianapolis, IN, EUA) 1:100 em solução salina isotônica 0,2 ml via subcutânea diariamente.

3.4.3 Timectomia

Animais dos grupos IV, V, X, e XI foram submetidos a timectomia total por sucção, pelo método de Sjodin e colaboradores¹⁰⁷. Nos animais dos grupos X e XI, este procedimento foi realizado após indução de diabetes química. Após indução de anestesia com XYL/KET (seção 3.2), os animais foram posicionados em decúbito dorsal em prancha de isopor e fixados com elásticos. O tórax foi anteriorizado através do posicionamento de uma ponta de pipeta de plástico no dorso dos animais. A seguir, foi realizada a anti-sepsia da parede torácica com etanol a 70%. Realizou-se uma incisão mediana de 4 centímetros sobre o esterno, seguida de afastamento das glândulas salivares superiormente. A seguir, incisou-se o esterno supero-inferiormente (2 centímetros). Introduziu-se a ponta de pipeta de Pasteur modificada para fazer a sucção de ambos os lobos do timo seguido pela receção dos mesmos com tesoura de Íris (Figura 1).

FIGURA 1 REALIZAÇÃO DE TIMECTOMIA POR SUCCÃO



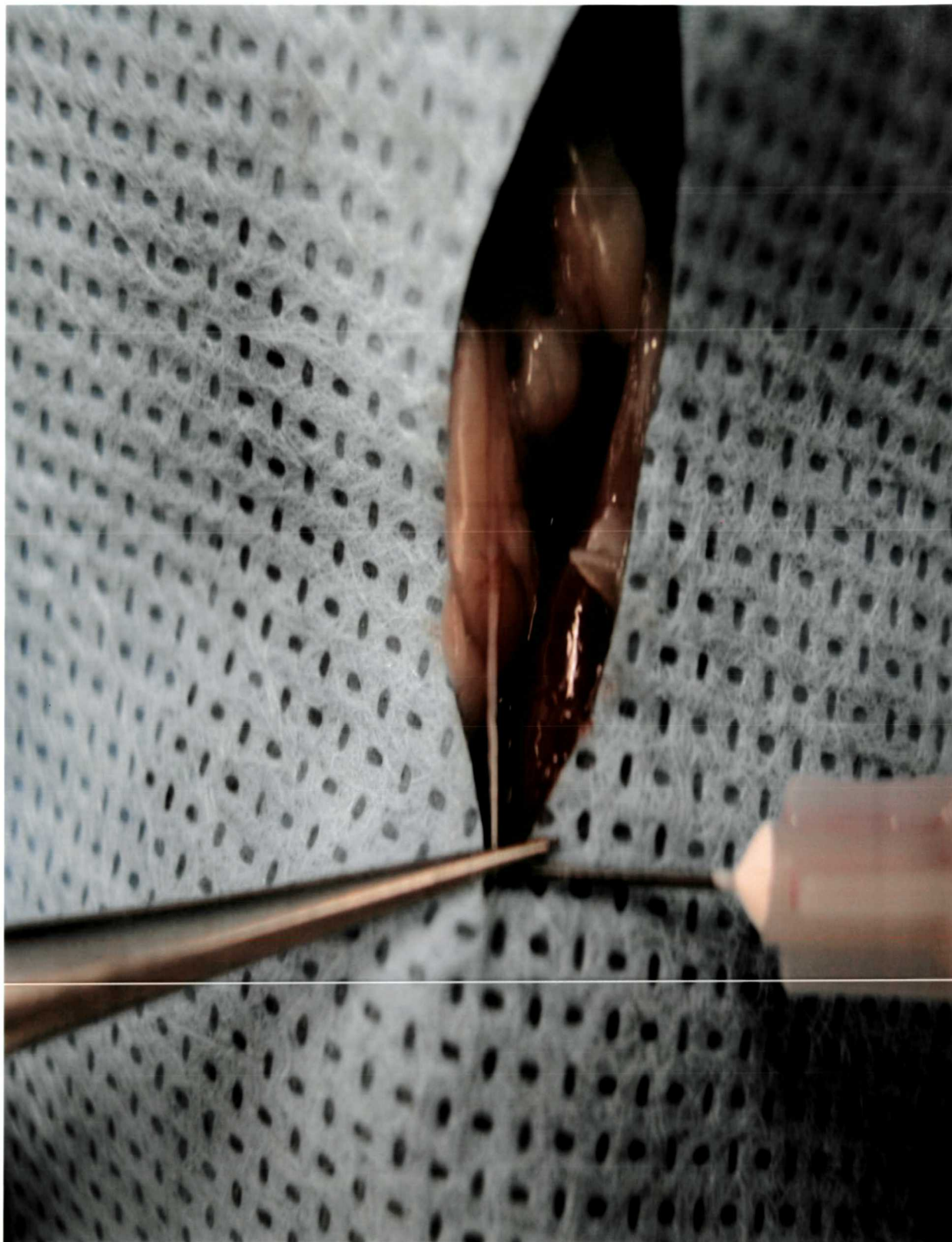
A cavidade torácica foi inspecionada, não se permitindo a presença de sangramentos ou de porções remanescentes do timo. As glândulas salivares foram reposicionadas, o tórax hiperinsuflado manualmente através de compressão abdominal, e a pele aproximada e clipada com cliques de aço de 9 milímetros (Milk Ron Precision Incorporation, Gardina, CA, EUA).

3.4.4 Transplante das Ilhotas de Langerhans

3.4.4.1 Injeção de colagenase e pancreatectomia nos doadores

As pancreatectomias foram realizadas com auxílio de microscópio de dissecação (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY, EUA) modelo AO569, com aumento de 10 vezes. Os doadores foram camundongos BALB/c (H-2^d). Os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia como descrito em 3.2. A seguir, foram posicionados em decúbito dorsal. Realizou-se a anti-sepsia da parede abdominal com etanol a 70%. Seqüencialmente se realizou uma incisão abdominal bicostal com ressecção do apêndice xifóide, exposição da cavidade abdominal e dissecação do ducto biliar comum com isolamento do mesmo logo após a união dos ductos hepáticos direito e esquerdo. O ducto biliar comum foi clampeado com clamp vascular (Bulldog) na sua junção com o duodeno e canulado com agulha de 27½G (Becton Dickinson) angulada a 90° (Figura 2). O pâncreas foi completamente distendido através da injeção de 3ml de solução de colagenase V (Sigma Corporation) no ducto biliar na concentração de 1 mg/ml, em solução salina balanceada de Hanks (Sigma Corporation). O tecido pancreático foi excisado, colocado em uma placa de Petri de 60x15 mm (Becton Dickinson), seccionado em pequenos fragmentos com tesoura de Íris, e mantido em gelo. Após a pancreatectomia, o tecido pancreático picado foi distribuído em tubos de polietileno de 50 ml (Falcon[®], Becton Dickinson), contendo 3-4 órgãos por tubo. Foram utilizados 3-7 doadores por receptor.

FIGURA 2 - CANULAÇÃO DO DUCTO BILIAR PARA INJEÇÃO DE COLAGENASE NO PÂNCREAS



3.4.4.2 Digestão do tecido exócrino do pâncreas

Os tubos contendo o tecido pancreático foram colocados em incubadora móvel (Fisher Scientifics) a 37°C durante 9-13 minutos, conforme o lote da colagenase em utilização. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 40 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada com 10% de soro de bezerro e submetida a agitação manual vigorosa durante 30 segundos e a 5 ciclos de lavagem-centrifugação a 950 rotações por minuto, cada um durando 5 minutos. Intercalados com os ciclos de centrifugação-lavagem das ilhotas foi realizado o desprezo do sobrenadante permanecendo no frasco somente o precipitado (“*pellet*”) contendo as ilhotas de Langerhans. Solução balanceada de Hanks com 10% de soro de bezerro foi adicionada após a primeira centrifugação (40ml/frasco). Do terceiro ao quinto ciclo de centrifugação-lavagem utilizou-se somente solução salina balanceada de Hanks gelada (40 ml/frasco/ciclo). Após desprezo do sobrenadante e adição de nova solução ao precipitado, seguiu-se agitação manual do frasco até dissolução completa do precipitado antes da centrifugação.

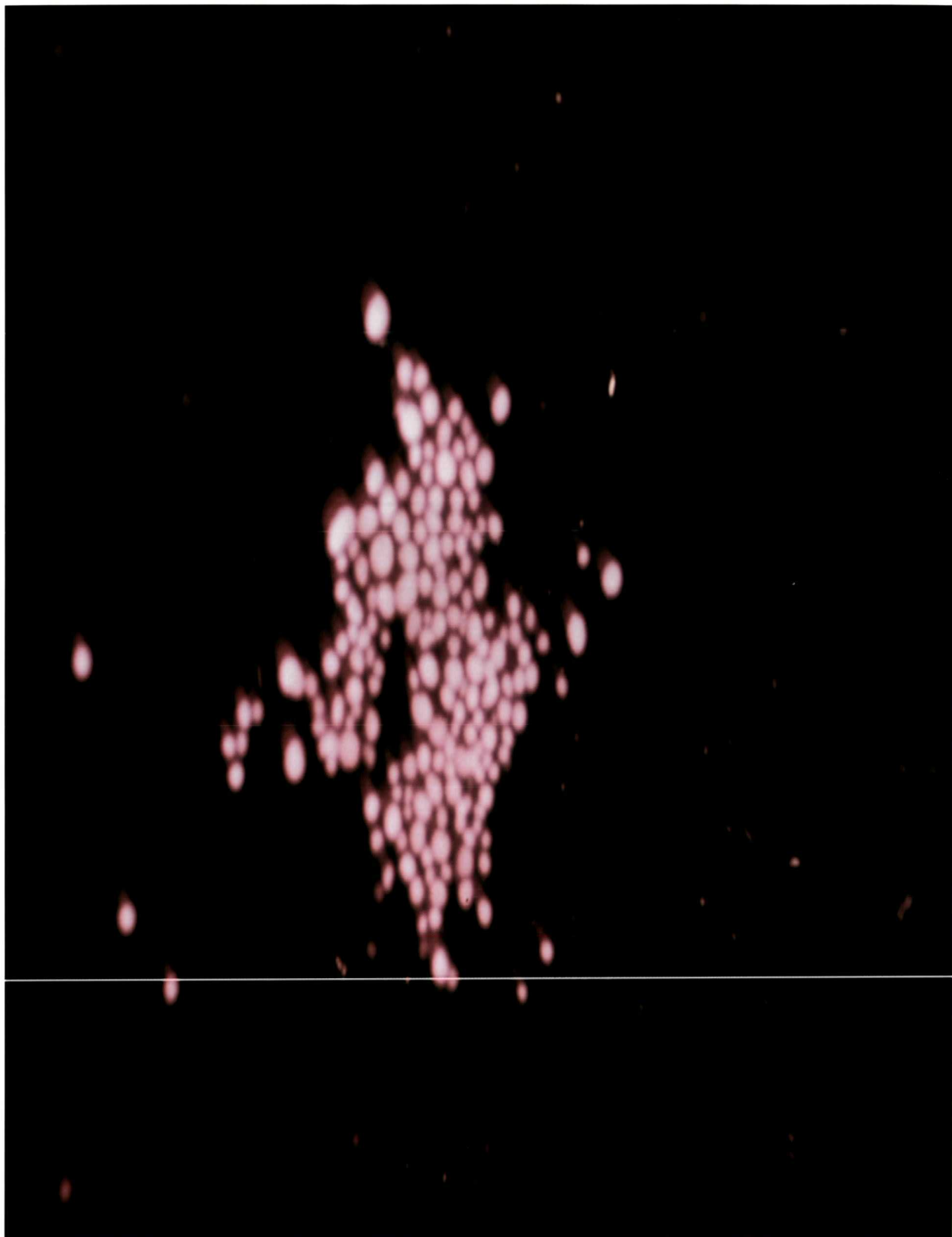
3.4.4.3 Purificação das ilhotas de Langerhans

Após o último ciclo de centrifugação e lavagem, foram adicionados a cada frasco 50 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada, evitando-se a formação de bolhas no precipitado. As ilhotas de Langerhans foram separadas do tecido exócrino do pâncreas através do método de Salvalaggio et al ⁹⁴. Resumidamente, a solução contendo ilhotas de Langerhans e tecido exócrino do pâncreas foi passada através de um separador celular de 100µm (Cell Strainer[®], Becton Dickinson) e lavado suavemente com 50 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada. A seguir, o separador celular foi invertido (180°). O seu conteúdo foi removido suavemente para o interior de placa de Petri, de 100x20 mm, através do enxágüe com 40 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada.

3.4.4.4 Pureza e viabilidade das ilhotas de Langerhans

Pureza e viabilidade das ilhotas de Langerhans foram medidas através do teste *in situ* da Ditizona¹⁵. Somente soluções contendo ilhotas de Langerhans com viabilidade e pureza maiores que 90% foram transplantadas (Figura 3).

FIGURA 3 ASPECTO FINAL DAS ILHOTAS DE LANGERHANS APÓS A PURIFICAÇÃO



3.4.4.5 Contagem das ilhotas de Langerhans

A solução final foi colocada em uma placa de Petri de 100x20mm. As ilhotas de Langerhans foram contadas com auxílio do microscópio de dissecação. Foram escolhidas somente as ilhotas de Langerhans sem rotura da membrana e com diâmetro entre 150-400 μ m. À medida que foram contadas, as ilhotas foram aspiradas com uma pipeta de Pasteur de vidro (Becton Dickinson) e colocadas em uma placa de Petri de 60x15 mm contendo solução salina balanceada de Hanks. Para cada alotransplante foram selecionadas 400 ilhotas de Langerhans (“400IE”).

3.4.4.6 Preparo para o implante das ilhotas de Langerhans

As ilhotas de Langerhans suspensas na solução salina balanceada de Hanks foram aspiradas com uma seringa de Hamilton[®] (Hamilton Corporation, Reno, NV, EUA) previamente preenchida com 0,3 ml de solução salina de Hanks, tendo acoplada em sua extremidade uma ponta de pipeta de microaspiração (Oxford, Sanford, ME, EUA). A seringa foi mantida na posição vertical até que as ilhotas de Langerhans fossem posicionadas, por ação da gravidade, na extremidade da ponta da pipeta de microaspiração. Nesta extremidade foi acoplado um tubo de polietileno medindo 0,965 mm de diâmetro e 10 centímetros de comprimento (Intramedic[®], Becton Dickinson), previamente infundido com etanol a 70% e solução salina balanceada de Hanks, alternadamente. Esta última permanecia no interior do tubo. As ilhotas de Langerhans foram injetadas no interior do tubo até o terço distal do seu comprimento. Neste ponto, o tubo foi dobrado sobre si mesmo, ocluído com um pequeno pedaço de fita adesiva, desacoplado da seringa e centrifugado a 800 rotações por minuto durante 4 minutos. A extremidade ocluída foi voltada para baixo com a finalidade de comprimir as ilhotas de Langerhans e facilitar a injeção. A seguir, o tubo contendo as ilhotas de Langerhans foi conectado novamente à seringa, evitando-se a entrada de ar no sistema. Desta forma, as ilhotas de Langerhans foram posicionadas na extremidade distal do tubo.

3.4.4.7 Transplante das ilhotas de Langerhans no receptor

Os receptores foram camundongos C57/BL6b (H-2^b). Os animais foram anestesiados com KET/XYL, conforme descrito em 3.3. Realizou-se tricotomia na região lombar esquerda e anti-sepsia com etanol a 70%, seguida de lombotomia esquerda com exposição do rim. Durante todo o procedimento, o rim foi constantemente irrigado com solução salina balanceada de Hanks utilizando-se uma seringa de 10ml (Becton Dickinson) para evitar o ressecamento de sua cápsula. A seguir, foi realizado um pequeno orifício feito na cápsula renal com a agulha de 23G (Becton Dickinson). A ponta de uma pipeta de Pasteur modificada foi introduzida entre o parênquima e a cápsula renal, confeccionando-se uma loja no espaço subcapsular com volume suficiente para acomodar as ilhotas de Langerhans. A ponta do tubo de polietileno, conectado à seringa de Hamilton[®], contendo as ilhotas de Langerhans centrifugadas, foi introduzida pelo orifício da cápsula na loja renal subcapsular. As ilhotas de Langerhans foram lentamente injetadas na loja subcapsular renal. O tubo foi retirado, e o rim novamente irrigado. O orifício criado na cápsula renal foi cauterizado com cautério oftálmico (Solan, Chicago, IL, EUA) e as ilhotas de Langerhans foram cuidadosamente espalhadas na loja renal subcapsular (Figura 4). O rim foi introduzido novamente na cavidade abdominal e a parede abdominal foi suturada com pontos separados de seda 4-0 (Ethicon, Sommerville, NJ, EUA).

FIGURA 4 ILHOTAS DE LANGERHANS APÓS INJEÇÃO NA LOJA SUBCAPSULAR DO RIM



3.4.4.8 Nefrectomia nos receptores dos transplantes de ilhotas de Langerhans

No 120º dia de pós-operatório, os animais com enxerto funcionante foram submetidos a nefrectomia esquerda. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sob anestesia. Realizou-se uma incisão abdominal mediana com exposição da cavidade abdominal. O rim esquerdo contendo o enxerto foi isolado e o pedículo vascular foi ligado com fio de algodão 3-0 e seccionado.

Nestes camundongos, a glicemia foi verificada no 5º dia após a nefrectomia, para comprovação do funcionamento prévio do enxerto. Assim, glicemia maior que 250 mg/dl foi considerada como indicativa do funcionamento prévio do enxerto, ou seja, de que a normoglicemia prévia devia-se as ilhotas de Langerhans funcionantes que foram transplantadas. Após esta confirmação os camundongos foram sacrificados conforme descrito em 3.2.

3.4.4.9 Exposição ao aloantígeno do doador

Camundongos diabéticos receberam tratamento com anti-CD45RB nos dias -1, 0 e 5 e também foram expostos aos seguintes aloantígenos: ilhotas de Langerhans dos doadores BALB/c (H-2^d) no grupo XV; ilhotas de Langerhans de camundongos não-doadores DBA1 (H-2^k) no grupo XVI (controle). A exposição ao antígeno foi realizada no dia zero através da injeção de 50 ilhotas de Langerhans no espaço subcapsular do rim direito, conforme descrito acima (seção 3.4.3.7).

3.4.4.10 Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério da Yale University, em sala mantida com temperatura ambiente entre 18 e 22°C.

Durante os três primeiros dias após a cirurgia (timectomias, transplantes de ilhotas de Langerhans e nefrectomias) os animais receberam Ibuprofen Pediátrico

20mg/ml diluído em água (Leader[®], Cardinal Health, Dublin, MI, EUA-5ml por frasco de água) e ração para roedores (Labdiet[®], PMI Nutrition International Incorporation, Brentwood, MO, EUA) moída e úmida. Após este período, os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*.

3.4.4.11 Avaliação da glicemia no pós-operatório

A glicemia dos animais foi verificada com glucômetro no 1^o, 2^o e 7^o dia de pós-operatório e depois a cada semana até apresentarem rejeição ou até o 120^o dia. Glicemia acima de 200mg/dl até o terceiro dia de pós-operatório foi considerada não-funcionamento primário do enxerto. Glicemia acima de 250 mg/dl em qualquer outro dia foi considerada rejeição aguda ao enxerto. Após 24 horas de confirmação de hiperglicemia, a glicemia foi novamente testada, para confirmação do diagnóstico de não-funcionamento primário ou de rejeição aguda. Camundongos com rejeição aguda do enxerto foram sacrificados conforme descrito em 3.2 e aqueles com não-funcionamento primário do enxerto foram sacrificados e excluídos do estudo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma comparação dois a dois dos grupos de animais submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans em relação à variável tempo de sobrevida dos enxertos, utilizando-se os testes não-paramétrico log-rank. Em todos os testes considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para os dados obtidos dos experimentos que envolveram citometria de fluxo, médias aritméticas com seus respectivos desvio padrões foram utilizadas entre os animais do mesmo grupo para que se determinasse em dias seriados quando haveria o estabelecimento do fenótipo linfocitário prévio ao tratamento (basal).

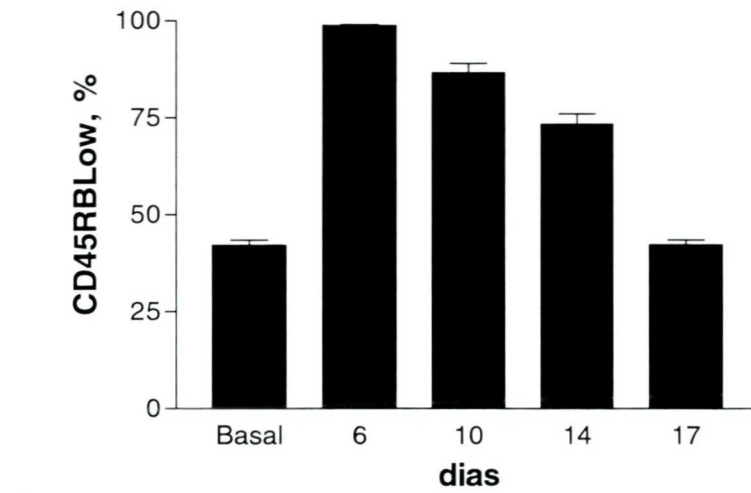
Foi utilizado os *software GraphPad Instat*[®] versão 3.05 e *Graphpad Prism*[®] versão 3.02 (San Diego, CA, EUA) para a análise estatística e elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

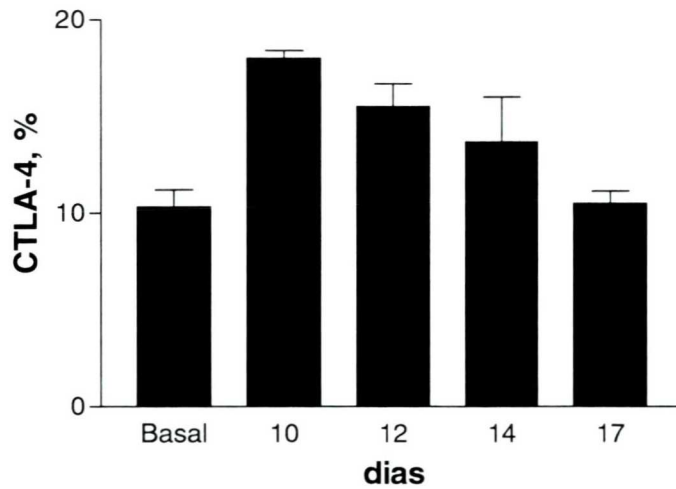
4.1 CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS CD4⁺ APÓS TRATAMENTO *STANDARD* COM ANTI-CD45RB

Utilizou-se animais do Grupo I (controle) e do Grupo II, anteriormente ao tratamento, para definição do nível basal da expressão das formas de CD45Rb e de CTLA-4. Houve uma marcante alteração da expressão das formas de CD45RB (Figura 5A) nos animais do Grupo II. Ao mesmo tempo, os animais do Grupo II apresentaram também uma diminuição lenta, linear e gradativa ao nível basal, com predominância da forma CD45RB^{Low} e de um aumento da expressão de CTLA-4 até o dia 17 após o tratamento (dia 17 vs nível basal, $p > 0,05$). É importante salientar que a expressão de CTLA-4 nos animais do Grupo II também aumentou rapidamente. Alcançou níveis máximos no dia 10 e apresentou um declínio de sua expressão que segue precisamente o comportamento da diminuição da expressão de CD45RB^{Low} em relação ao nível basal (Figura 5B). Como se tentou testar no presente estudo se linfócitos CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺ eram os responsáveis pelo mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB, a determinação da cinética da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 constituiu-se no primeiro passo para que se testasse tal hipótese.

FIGURA 5- EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45 (A) E CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4⁺ DOS GRUPOS I E II



A



B

Basal - nível basal, correspondente a expressão (%) das formas de CD45RB e CTLA-4 em camundongos que não receberam tratamento (Grupo I, controle) e de camundongos do Grupo II anteriormente ao tratamento. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em cada dia da análise. Resultados foram demonstrados como a média da porcentagem dos linfócitos CD4⁺ em cada dia de análise.

4.2 EFEITO DO USO DE MÚLTIPLAS DOSES DE ANTI-CD45RB NA SOBREVIDA DO ALOENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS

Todos os animais que não receberam tratamento e foram submetidos a transplante de ilhotas de Langerhans (controle, Grupo VI) apresentaram rejeição ao aloenxerto entre o 10º e o 19º dia de pós-operatório. Os camundongos tratados com 3 doses regulares (*standard*) do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 nos dias -1, 0 e 5 (Grupo VII) apresentaram maior sobrevida do enxerto em relação ao Grupo VI, resultado esse estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Finalmente, camundongos que receberam tratamento *standard* com 3 doses regulares do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2, seguidas por injeção única intra-peritoneal do mesmo a cada 15 dias (grupo VIII) não apresentaram rejeição ao aloenxerto até o dia 35, diminuindo assim os episódios de rejeição precoce ($p < 0,05$). Uma das hipóteses estabelecidas no presente estudo, previa que o tratamento com múltiplas doses regulares do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 fosse capaz de aumentar a sobrevida do enxerto de ilhotas de Langerhans. No entanto, contrariando a idéia inicial, o uso de múltiplas doses de anti-CD45RB MB23G2 não foi capaz de aumentar a sobrevida do enxerto (análise ao dia 120), ocorrendo rejeição ao aloenxerto, porém, em uma fase mais tardia (Figura 6).

FIGURA 6 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS VI, VII E VIII

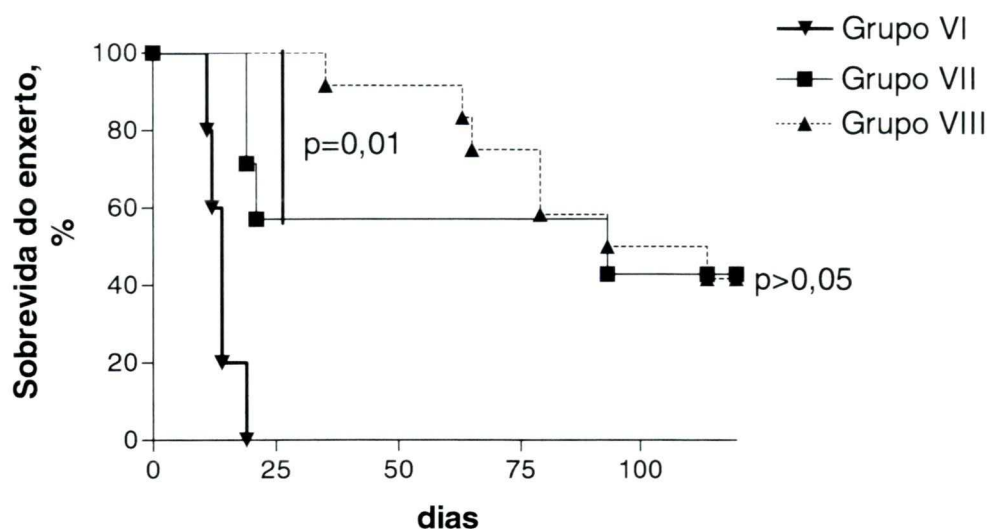


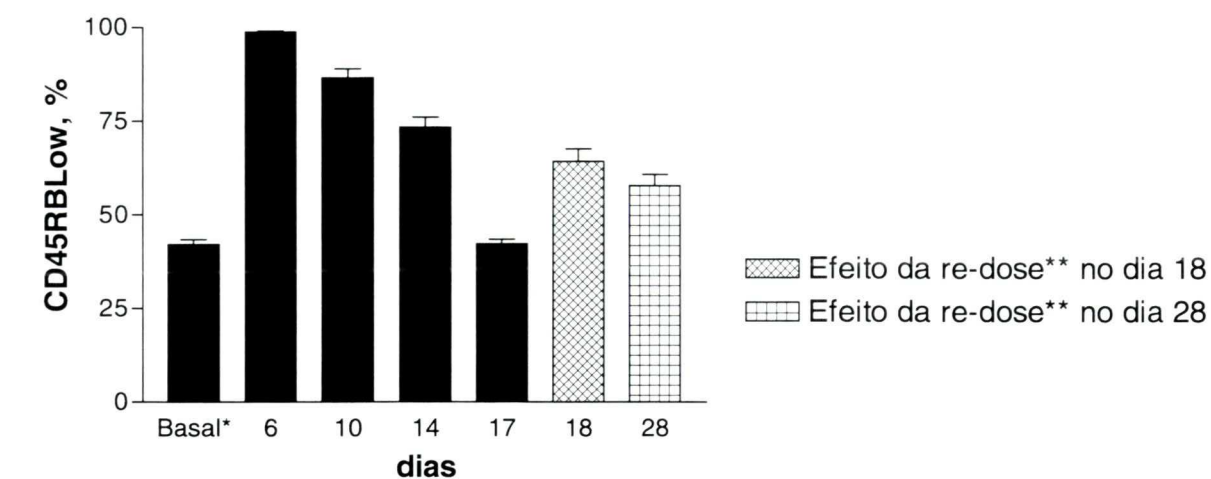
Figura demonstra a sobrevivência do enxerto em dias (eixo x) para cada grupo (eixo y). Os grupos incluídos são: camundongos sem tratamento (Grupo VI) $n = 5$; camundongos que receberam tratamento standard com anti-CD45RB $100 \mu\text{g}$ i.v. nos dias -1, 0 e 5 (Grupo VII) $n = 7$; camundongos que receberam tratamento standard com anti-CD45RB -1, 0 e 5 i.v. e nova dose de anti-CD45RB (uma dose intraperitoneal) a cada 15 dias (Grupo VIII) $n = 12$.

* Grupo VIII vs Grupo VII; $p=0,01$ no dia 30, $p>0,05$ no dia 120.

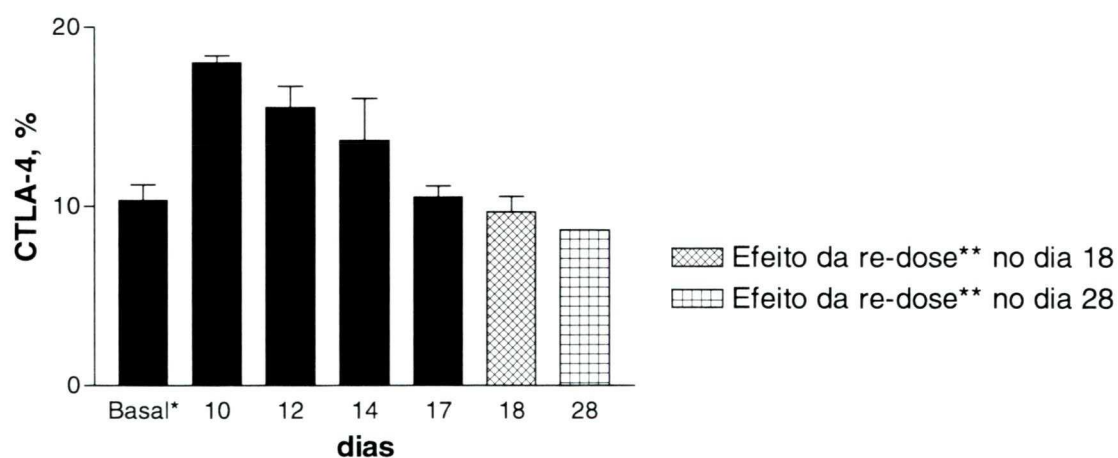
4.3 EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E DE CTLA-4 APÓS MÚLTIPLAS DOSES DE ANTI-CD45RB

A expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 foram estudadas novamente após a utilização do esquema de múltiplas doses de anti-CD45RB. Múltiplas alternâncias da expressão das formas de CD45RB ocorreram em direção a subpopulação CD45RB^{Low} (Figura 7A). No entanto, verificou-se que a expressão de CTLA-4 não é aumentada novamente com múltiplas doses de anti-CD45RB (Figura 7B).

FIGURA 7 - CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB (A) E DE CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4⁺ NO GRUPO III



A



B

Basal* - nível basal, correspondente a expressão (%) das formas de CD45RB e CTLA-4 em camundongos que não receberam tratamento (Grupo I, controle) e de camundongos do Grupo II anteriormente ao tratamento. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em cada dia da análise. Re-dose** foi obtida através de injeções intraperitoneais de anti-CD45RB a cada 15 dias (Grupo III). Resultados foram demonstrados como a média da porcentagem de linfócitos CD4⁺ em cada dia de análise. CD45RB^{Low} nos dias 18 e 28 vs nível basal, $p < 0,05$; CTLA-4 nos dias 17, 18 e 28 vs nível basal, $p > 0,05$.

4.4 SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NO GRUPO IX

Para que se confirmasse o papel da ausência de CTLA-4 como fator determinante do não aumento da vida-média do aloenxerto após múltiplas doses de tratamento com anti-CD45RB foi a seguir testado se um transplante de ilhotas de Langerhans em animais tratados com anti-CD45RB na ausência de CTLA-4 seria capaz de evitar a rejeição ao aloenxerto. Desta forma foi proposto um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans no qual os receptores recebiam tratamento “*standard* ” com 3 doses de anti-CD45RB, e a injeção de ilhotas de Langerhans era postergada até o dia 18 após tratamento, recebendo re-dosagem um dia antes de receber o enxerto. Nesta situação, há uma alternância na expressão da forma de CD45RB predominante, com maior número de linfócitos CD45RB^{Low} presentes, porém não há um aumento de CTLA-4 (Figura 7). Surpreendentemente, animais que receberam nova dosagem de anti-CD45RB e foram transplantados no dia 19 não foram capazes de sustentar sobrevida longa do aloenxerto, apresentando rejeição em um período precoce, como se não tivessem recebido tratamento (Figura 8).

FIGURA 8 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NO GRUPO IX

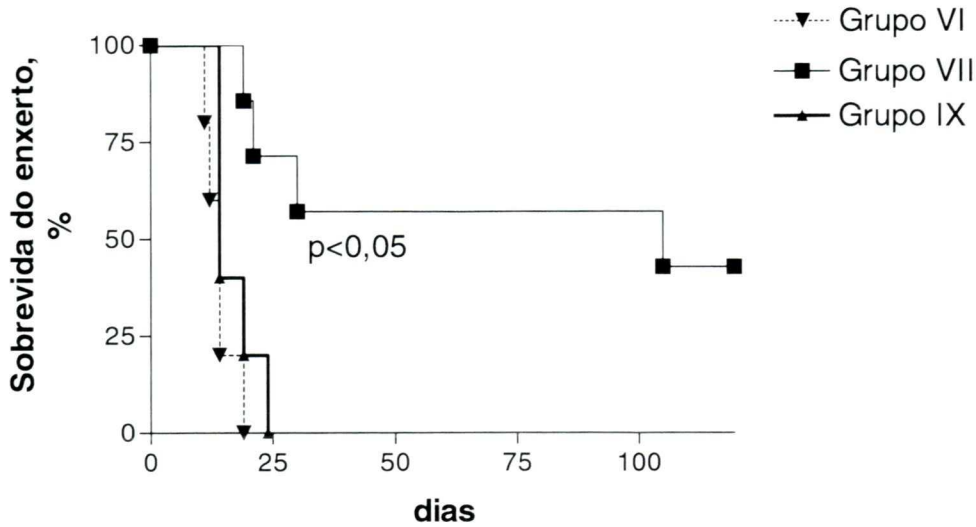


Figura demonstra a sobrevivência do enxerto em dias (eixo x) para cada grupo (eixo y). Os grupos incluídos são: camundongos sem tratamento (Grupo VI) $n = 5$; camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 μg i.v. nos dias -1, 0 e 5 (Grupo VII) $n = 7$; e camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB -1, 0 e 5 i.v., seguido de redosagem com anti-CD45RB (dose única intraperitoneal) no dia 18 com transplante realizado no dia 19 (Grupo IX) $n = 5$.

Grupo VI vs. Grupo VII, $p < 0,05$;

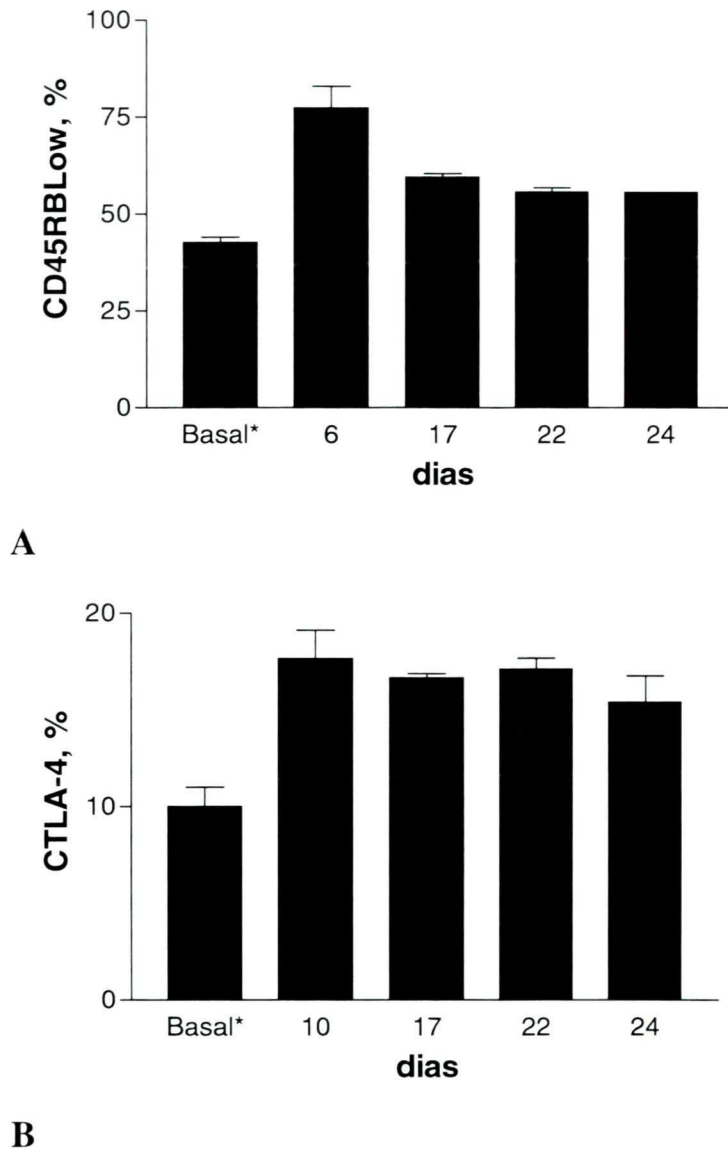
Grupo VI vs. Grupo IX; $p > 0,05$.

4.5 CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB E CTLA-4 EM LINFÓCITOS CD4⁺ APÓS TRATAMENTO COM ANTI-CD45RB NA AUSÊNCIA DO TIMO

Com o intuito de manter o fenótipo das formas de CD45RB direcionado para CD45RB^{Low} tentou-se remover o timo para que se evitasse a emergência de linfócitos virgens CD45RB^{High}. A análise da expressão das formas de CD45RB nos animais do grupo V demonstrou que também ocorre um predomínio da forma CD45RB^{Low}. Ao mesmo tempo, a expressão de CTLA-4 apresenta também um aumento rápido e diminuição progressiva. Contudo, diferentemente do que foi achado em animais que não tiveram o timo removido, os linfócitos CD4⁺ não apresentam um retorno da expressão das formas de CD45RB e CTLA-4 aos níveis basais no dia 17 após

tratamento. Na verdade, o retorno ocorre uma semana mais tarde, no dia 24 após início do tratamento (Figura 9).

FIGURA 9 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO DAS FORMAS DE CD45RB (A) E CTLA-4 (B) EM LINFÓCITOS CD4⁺ NOS GRUPOS IV e V

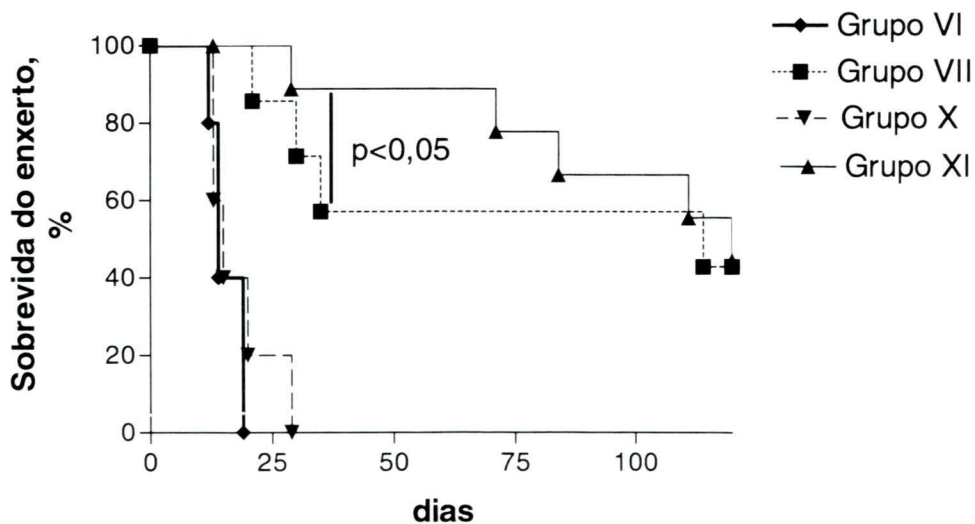


Timectomias foram realizadas no dia -7. Basal* - nível basal, correspondente a expressão (%) das formas de CD45RB e CTLA-4 em camundongos que não receberam tratamento (Grupo IV, controle) e de camundongos do Grupo V anteriormente ao tratamento. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em cada dia da análise. Resultados foram demonstrados como a média da porcentagem de linfócitos CD4⁺ em cada dia de análise.

4.6 EFEITO DA TIMECTOMIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS EM ANIMAIS TRATADOS COM ANTI-CD45RB

Conforme demonstrado em camundongos que não sofreram remoção do timo, todos os animais que não receberam tratamento e tiveram seu timo removido (grupo X) apresentaram rejeição ao aloenxerto na segunda semana de pós-operatório. Camundongos que receberam tratamento com anti-CD45RB e prévia remoção do timo (grupo XI) não apresentaram rejeição ao aloenxerto até o dia 30. Este grupo obteve uma diminuição dos episódios de rejeição precoce em relação aos animais do Grupo VII ($p < 0,05$). Contrariando a ideia inicial que a remoção parcial de linfócitos $CD4+CD45RB^{High}CTLA-4^{-}$ seria capaz de aumentar a vida-média do enxerto, não houve um aumento significativo da sobrevida das ilhotas de Langerhans (dia 120) que foram transplantadas, ocorrendo rejeição aguda do aloenxerto em uma fase mais tardia (dia 120).

FIGURA 10 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS X E XI



Timectomias foram realizadas no dia -7, e os transplantes no dia zero. Figura demonstra a sobrevivência do enxerto em dias (eixo x) para cada grupo (eixo y). Os grupos incluídos são: camundongos sem tratamento (Grupo VI) $n = 5$; camundongos que receberam tratamento "standard" com anti-CD45RB $100 \mu\text{g}$ i.v. nos dias -1, 0 e 5 (Grupo VII) $n = 7$; camundongos que sofreram timectomia e não receberam tratamento (Grupo X) $n=5$, e camundongos que sofreram timectomia e receberam tratamento "standard" de anti-CD45RB nos dias -1, 0 e 5 i.v. (Grupo XI) $n = 10$. *Grupo XI vs Grupo VII, $p < 0,05$ no dia 30.; $p > 0,05$ no dia 120.

4.7 PAPEL DOS LINFÓCITOS $CD4^+CD45RB^{LOW}CTLA-4^+$ NO AUMENTO DA SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS MEDIADO POR ANTI-CD45RB

Após a demonstração da importância de CTLA-4 no mecanismo de ação de anti-CD45RB, tornou-se imperativo testar isoladamente a importância de cada uma das formas de CD45RB. Para isto, foi examinado se transplante de ilhotas de Langerhans em um ambiente rico em linfócitos $CD4^+CD45RB^{LOW}$ ou $CD4^+CD45RB^{High}$ gerados após tratamento com anti-CD45RB seria capaz de evitar a rejeição do enxerto e/ou aumentar sua vida média. Com este propósito, foi desenvolvido um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans e uso de anti-CD45RB em que se postergava o implante do aloenxerto, verificando-se assim se estas diferentes populações linfocitárias exerceriam papel diferente na rejeição ou aceitação do enxerto. Receptores foram tratados com dose “*standard*” de anti-CD45RB nos dias -1, 0, and 5, e receberam o enxerto em tempos diferentes, nos quais se conhecia previamente o fenótipo dos linfócitos $CD4^+$ (Figura 5).

Assim, os animais que receberam implante do enxerto no dia 18 (Grupo XIV) rejeitaram os aloenxertos como se não tivessem recebido tratamento prévio ($p > 0,05$ vs Grupo VI). Demonstrou-se ainda que se o transplante fosse postergado até o dia 10 (Grupo XIII) os camundongos também rejeitaram o enxerto de maneira precoce. Somente 10% dos animais deste grupo apresentaram sobrevida do aloenxerto maior que 120 dias ($p < 0,05$ vs Grupo VI e XIV). Se o transplante fosse postergado somente até o dia 7 (Grupo XII), os camundongos ainda seriam capazes de evitar rejeição ao aloenxerto, apresentando sobrevida do aloenxerto por mais de 120 dias em 33% dos animais ($p < 0,05$ vs Grupos VI, XIII e XIV; $p > 0,05$ vs Grupo VII) - Figura 11.

FIGURA 11– SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS XII, XIII E XIV

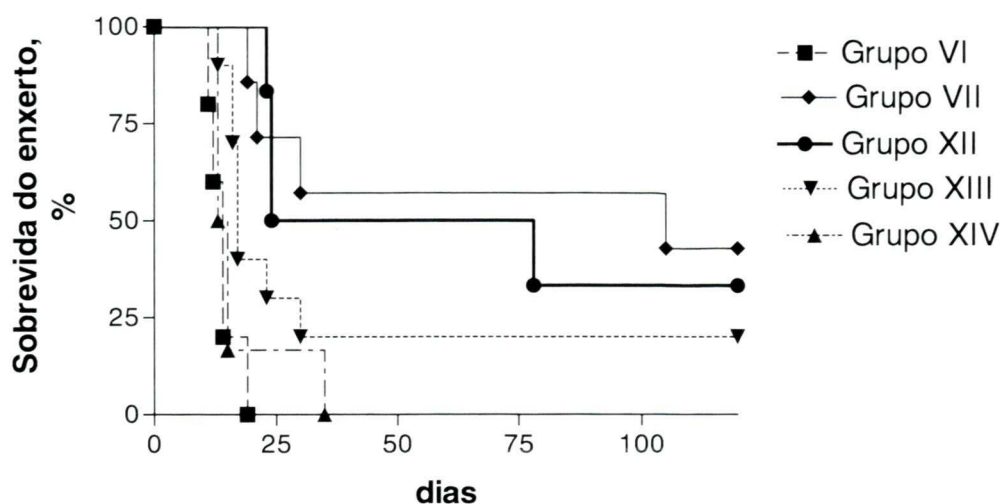
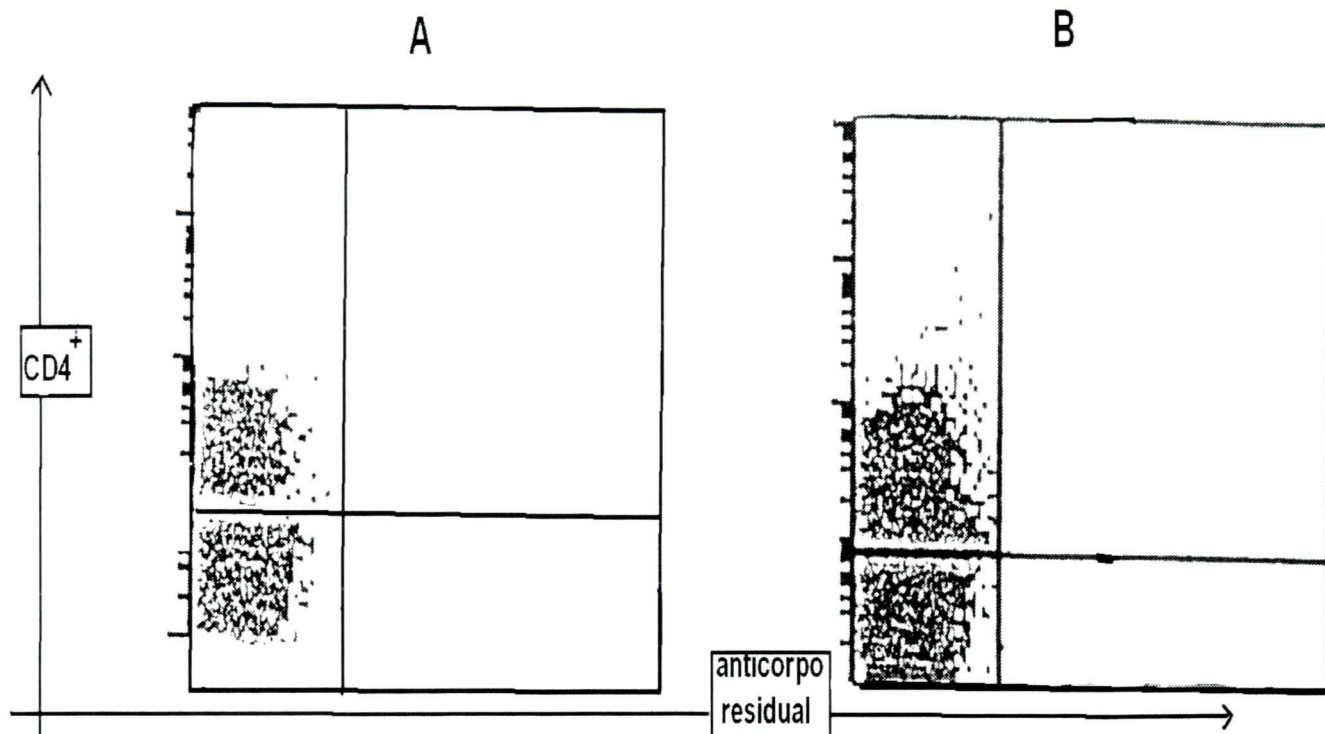


Figura demonstra a sobrevivência do enxerto em dias (eixo x) para cada grupo (eixo y). Os grupos incluídos são: camundongos sem tratamento (Grupo VI) $n = 5$; camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5 (Grupo VII) $n=7$; ; camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5 e tiveram seu transplante adiado até o dia 7 (Grupo XII) $n = 6$; camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5 e tiveram seu transplante adiado até o dia 10 (Grupo XIII) $n=10$; e camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5 e tiveram seu transplante adiado até o dia 18 (Grupo XIV) $n = 6$. * Grupo XII vs Grupos VI, XIII, e XIV, $p<0,05$; Grupo VII vs Grupo XII, $p>0,05$.

4.8 AVALIAÇÃO DE ANTICORPO RESIDUAL ANTI-CD45RB NA MEMBRANA DOS LINFÓCITOS CD4⁺ E NA CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA APÓS TRATAMENTO STANDARD

De maneira importante, a avaliação da presença de anti-CD45RB residual foi negativa a partir de 48 horas após a administração da última dose de anti-CD45RB. Ou seja, no momento da avaliação por citometria de fluxo o anticorpo já não estava presente na membrana dos linfócitos CD4⁺. Detectou-se a presença de anti-CD45 na membrana celular de menos de 0,01% dos linfócitos CD4⁺ e em menos de 0,001% dos linfócitos CD4⁺ no sangue periférico (Figura 12).

FIGURA 12 – AUSÊNCIA DE ANTICORPO RESIDUAL NA MEMBRANA DOS LINFÓCITOS CD4⁺ APÓS DOIS DIAS DA ÚLTIMA DOSE DE ANTI-CD45RB



Expressão de anticorpo residual no sangue periférico (A) e esplenócitos (B)

4.9 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ANTÍGENO DO DOADOR NA SOBREVIVÊNCIA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS MEDIADO POR ANTI-CD45RB

Formulou-se a hipótese que uma exposição ao antígeno do doador seria importante para a obtenção de resultados satisfatórios com o uso do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Para testar esta hipótese, utilizou-se um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans onde se implantava 50 ilhotas de Langerhans específicas dos doadores camundongos BALB/c no espaço subcapsular do rim direito dos receptores durante o tratamento com anti-CD45RB (no dia zero), e se postergava o

transplante do aloenxerto até o dia 10. Ilhotas de Langerhans de camundongos DBA1 (não específicas do doador) implantadas no mesmo dia e número serviram como grupo controle.

Demonstrou-se que o grupo de camundongos que foram expostos ao antígeno específico do doador não rejeitaram o enxerto da mesma maneira que animais que não foram tratados ($p < 0,05$ vs Grupo VI). Estes animais mantiveram suas ilhotas de Langerhans funcionantes até o dia 120 do estudo (60%). Somente 10% dos animais do grupo XV que não foi exposto ao antígeno (Grupo XIII) apresentaram enxerto funcional até o dia 120 ($p < 0,05$). Por outro lado, nenhum dos animais deste grupo que foram expostos ao antígeno não específico do doador (Grupo XVI) foram capazes de manter seus enxertos funcionantes até o dia 120 ($p < 0,03$) - Figura 13.

FIGURA 13 – SOBREVIDA DO ENXERTO DE ILHOTAS DE LANGERHANS NOS ANIMAIS DOS GRUPOS XV E XVI

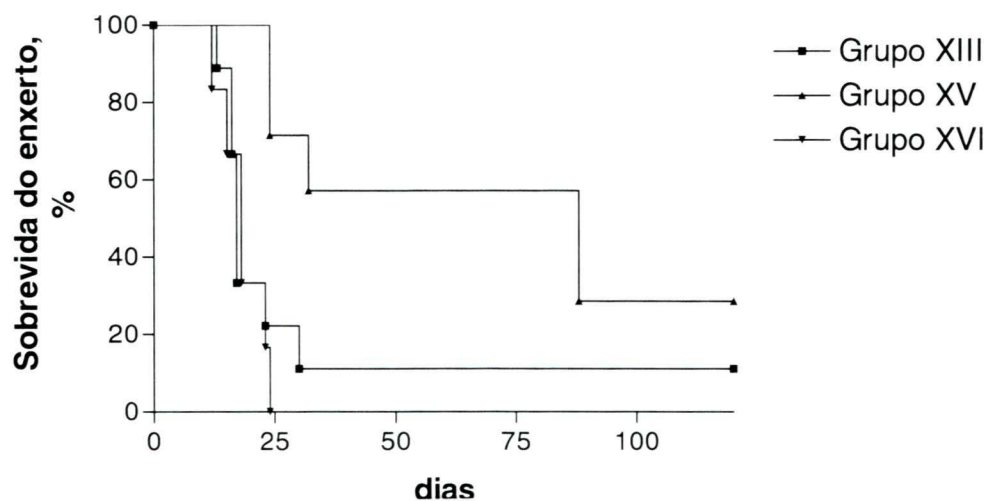


Figura demonstra a sobrevivência do enxerto em dias (eixo x) para cada grupo (eixo y). Os grupos incluídos são: camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5 e tiveram seu transplante adiado até o dia 10 (Grupo XIII) $n=10$; camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5, receberam injeção de 50 ilhotas de Langerhans específicas do doador no dia 0 e tiveram seu transplante adiado até o dia 10 (Grupo XV), $n = 6$, e camundongos que receberam tratamento *standard* com anti-CD45RB 100 µg i.v. nos dias -1, 0 e 5, receberam injeção de 50 ilhotas de Langerhans não específicas do doador no dia 0 e tiveram seu transplante adiado até o dia 10 (Grupo XVI), $n=6$.* Grupo XV vs Grupos XVI e XIII (no dia 120 do experimento), $p < 0,03$.

5 DISCUSSÃO

O método de isolamento das ilhotas de Langerhans através da digestão do tecido pancreático com a enzima colagenase e de purificação com o uso de separador celular ainda apresenta imperfeições. Conforme demonstrado pelo grande número de doadores utilizados para obtenção do número adequado de ilhotas de Langerhans, vê-se que o método ainda é custoso, demorado e pouco eficiente. Esse é um problema comum nos estudos experimentais com transplante de ilhotas de Langerhans, bem como ponto crítico em estudo e evolução em protocolos clínicos. No entanto, modelos experimentais que utilizam o transplante das ilhotas de Langerhans em murinos para estudos de imunologia de transplante de órgãos apresentam vantagens em relação aos modelos experimentais de transplante de outros órgãos. Transplante cardíaco e hepático não impõem um número de barreiras imunológicas suficientes ao receptor. Já o transplante de pele, pulmão e de intestino não permitem um estudo claro e definido dos mecanismos imunológicos de reação ao aloenxerto uma vez que apresentam células do sistema imune próprias, que são elementos-chave da resposta imune a estes enxertos. Desta forma o transplante da ilhotas de Langerhans apresenta-se como modelo experimental que reproduz de maneira fidedigna a resposta imune ao aloenxerto. Também mostra como outros fatores estão envolvidos no sucesso de transplante: preservação adequada do enxerto; efeito da preservação na toxicidade ao enxerto e; suscetibilidade específica de cada célula à rejeição.

Como se tentou provar no presente estudo que linfócitos $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ eram os responsáveis pelo mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB, a determinação da cinética da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 constituiu-se no primeiro passo para que se testasse esta hipótese. Os resultados deste estudo mostraram que uma marcante alteração da expressão das formas de CD45RB também ocorreu. Ao mesmo tempo, houve uma diminuição progressiva da expressão da forma $CD45RB^{Low}$. Ainda se verificou que acontece uma diminuição também progressiva da expressão de CTLA-4 até o dia 17

após o início do tratamento, o que segue o mesmo padrão de alteração das formas de CD45 retornando ao nível basal.

Gao et al. (1999) demonstraram que os linfócitos CD4⁺ de animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB são os responsáveis pela modulação do sistema imune. Conseqüentemente há um aumento da sobrevida dos enxertos e indução de tolerância imunológica³⁰. A associação entre a mudança na expressão das formas de CD45RB e a sobrevida dos enxertos foi comprovada também por Basadonna et al. em um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans¹¹. Lazarovits et al. (1996) também observaram um aumento significativo da sobrevida dos enxerto dos animais tratados com anti-CD45RB em um modelo de transplante renal em camundongos⁵⁵.

A determinação da cinética da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4 foi fundamental para que se entendesse inicialmente que a mesma é dinâmica. As alterações na formas de CD45 e CTLA-4 ocorrem por um tempo restrito e são concomitantes. Desta forma, pode-se presumir que o efeito “imune” de anti-CD45RB seja limitado até a segunda semana do implante do enxerto e do tratamento.

O presente estudo não identificou uma relação entre diminuição transitória no número de linfócitos CD4⁺ no sangue periférico de camundongos submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans. Basadonna et al (1998) foram os primeiros a demonstrar que a administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB produz esta diminuição transitória no número de linfócitos. Esse número retorna ao normal na segunda semana de pós-operatório. Os autores observaram ainda que o número de linfócitos CD4⁺ no baço e no tecido linfóide não se modifica com a administração do anticorpo. Entretanto, esta diminuição transitória dos linfócitos não foi relacionada com episódios de rejeição e com o mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Ainda no mesmo estudo, 50% dos animais tratados com anti-CD45RB tenham apresentado sobrevida longa do enxerto de ilhotas de Langerhans, a grande maioria dos animais apresentou rejeição entre a segunda e terceira semana do tratamento¹¹.

O presente estudo demonstrou que a cinética da mudança nas formas de CD45 e na expressão de CTLA-4 são limitadas, ocorrendo um retorno a níveis basais no dia 17, podendo ser o motivo da rejeição em 50% dos animais na segunda ou terceira semana após o transplante. Fecteau et al (2001) demonstraram que o mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB é também mediado pela molécula CTLA-4²⁷. Porém, de maneira mais importante, a idéia de que se essa cinética possa ser alterada, implica em uma possível melhoria na sobrevida do enxerto.

Um dos objetivos principais deste trabalho foi avaliar se alterou o efeito da mudança da cinética das formas de CD45 e de CTLA-4, o que poderia aumentar a eficácia do uso de anti-CD45RB, melhorando a sobrevida do enxerto. Com esta finalidade foi testado se múltiplas doses do anticorpo monoclonal anti-CD45RB manteria a população de linfócitos CD4⁺ com o fenótipo desejado (CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺) e, ao mesmo tempo, se induziria um aumento da sobrevida do enxerto neste modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans. Optou-se por novas injeções de anti-CD45RB a cada 15 dias, baseado no resultado da cinética da expressão das formas de CD45RB e de CTLA-4.

Optou-se pelo uso de novas injeções de anti-CD45RB via intraperitoneal após se observar que alguns animais morreram depois da terceira ou quarta nova dose do anticorpo (dia 45 ou 60). Achados similares foram descritos pelo grupo de Miami que atribuiu este efeito a um possível desenvolvimento de doença do soro nos animais (Inverardi et al, não publicado).

Conforme estudos anteriores de Basadonna et al (1998), Freitas (2000) e Fecteau et al (2001), todos os animais que não receberam tratamento apresentaram rejeição ao aloenxerto na segunda semana de pós-operatório (entre os dias 13 e o 19)^{11,27,29}. Neste estudo, os camundongos tratados com 3 doses regulares do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 apresentaram maior sobrevida do enxerto. Cerca de 50% dos animais apresentando sobrevida longa do enxerto por mais de 120 dias. A outra metade apresentou rejeição precoce também entre a segunda e terceira semana pós-operatória. Camundongos que receberam múltiplas doses de anti-CD45RB após o

tratamento *standard* não apresentaram rejeição ao aloenxerto até o dia 35. Assim se conseguiu diminuir os episódios de rejeição precoce (análise realizada no dia 30). No entanto, contrariando a idéia inicial de que um tratamento com maior número de doses de anti-CD45RB seria capaz de aumentar a sobrevida do enxerto, não houve um aumento significativo da sobrevida das ilhotas de Langerhans que foram transplantadas, ocorrendo rejeição tardia (análise realizada no dia 120).

Em busca de uma explicação plausível para a melhoria apenas parcial ou temporária do esquema terapêutico, novos estudos de cinética foram conduzidos. Conforme previsto, múltiplas alternâncias da expressão das formas de CD45RB ocorreram em direção a subpopulação CD45RB^{Low}. Porém, de maneira inesperada, verificou-se que a expressão de CTLA-4 não é aumentada novamente com o uso de múltiplas doses de anti-CD45RB.

Para que se confirmasse que a ausência de CTLA-4 foi o fator determinante da não melhoria da sobrevida do enxerto foi a seguir testado se o uso de múltiplas doses de anti-CD45RB (na ausência de CTLA-4) seria capaz de evitar a rejeição ao aloenxerto. Desta forma, estabeleceu-se um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans no qual os receptores recebiam tratamento “*standard*” com 3 doses de anti-CD45RB. A injeção de ilhotas de Langerhans era postergada até o dia 19 após o tratamento. A seguir, os animais recebiam nova dosagem um dia antes da transplante do enxerto. Nesta situação, há uma alternância na expressão da forma de CD45RB predominante, com maior número de linfócitos CD45RB^{Low} presentes. Porém, não há um aumento de CTLA-4. O modelo pode assim confirmar se a ausência de CTLA-4 agiu como fator determinante do não aumento da sobrevida do aloenxerto após múltiplas doses de tratamento com anti-CD45RB. Os animais utilizados neste modelo experimental não sustentaram uma sobrevida longa do aloenxerto, apresentando rejeição em um período precoce, como se não tivessem recebido tratamento.

CTLA-4 é uma molécula que regula negativamente a resposta imune, através da ativação intracelular de sinais supressores da divisão celular. Acreditava-se que

para que CTLA-4 fosse expresso, houvesse a necessidade da ocorrência de ativação linfocitária⁶². No entanto, Fecteau et al (2001) demonstraram que anti-CD45RB é capaz de aumentar a expressão de CTLA-4 sem que ocorra ativação celular²⁷. Já que outras estratégias que visam o aumento da expressão de CTLA-4 são falhas ou pouco eficazes, a utilização de anti-CD45RB é considerada atualmente a única maneira de se aumentar o nível da expressão de CTLA-4 em protocolos de imunossupressão e de indução de tolerância imunológica^{67,88}.

Embora ainda não se tenha testado um modelo *in vivo* adequado para o estudo do comportamento da expressão de CTLA-4, muito se conhece do seu mecanismo molecular e dos sinais intracelulares que podem advir da ligação de CTLA-4 com seus ligantes.

Diversos autores também estudaram a expressão de CTLA-4 no compartimento intracelular de linfócitos CD4⁺ com expressão de CD45RB^{Low}, mostrando ausência da expressão de CTLA-4 de superfície ou intracelular em linfócitos CD4⁺ com expressão de CD45RB^{High}^{3,63,67}. Outros mostraram a expressão de CTLA-4 no interior do complexo de Golgi^{37,58,63,118}.

Após a interação da APC com o linfócito CD4, o complexo de Golgi se posiciona voltado para a face da célula em que ocorre o contato. Isto resulta na secreção de proteínas como citocinas ou grânulos citotóxicos no sítio de contato intercelular^{14,58}. Como as proteínas secretadas e proteínas de membrana utilizam o mesmo mecanismo de exportação, ocorre também a secreção direcionada da proteína de membrana CTLA-4. Por ser instável a sua presença na superfície celular mediando a interação linfócitos-APCs, ela é reciclada continuamente entre o compartimento intracelular e a superfície linfocitária^{3,63,104}. A presença de CTLA-4 no compartimento intracelular e sua ciclagem para a superfície celular possivelmente representa a necessidade de limitar os níveis dessa molécula potente e de alta afinidade às moléculas B7-1 e B7-2 em relação à molécula CD28^{59,63}.

Mais recentemente, descobriu-se também que esta molécula é capaz de regular a progressão do ciclo celular. CTLA-4 controla a produção de IL-2 e a transcrição de

importantes enzimas intracelulares que são requeridas para a progressão de G0 para G1¹⁹. A cinética do mecanismo inibitório de CTLA-4 *in vitro* também é bem caracterizada, bem como as modificações que ocorrem na membrana celular^{18,19,92}.

O modelo experimental aqui proposto para o estudo da cinética e da importância da molécula de CTLA-4 no mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB demonstrou-se de simples execução e fácil reprodutibilidade. Embora a ausência da nova expressão de CTLA-4 seja no mínimo curiosa, não se conseguiu entender exatamente os motivos da mesma. Porém, é provável que a ausência da expressão de CTLA-4 tenha sido responsável pela não melhoria da sobrevida do enxerto de ilhotas de Langerhans com o esquema terapêutico que utilizou após múltiplas injeções de anti-CD45RB. Eventualmente, estudos experimentais futuros utilizando outros modelos animais, como camundongos que não expressam CTLA-4 e seus ligantes (“*CTLA-4 triple knock-out*”) possam esclarecer de maneira mais clara como CTLA-4 interfere no mecanismo de ação de anti-CD45RB.

Demonstrada a importância de CTLA-4 no mecanismo de ação de anti-CD45RB, tornou-se imperativo testar isoladamente a importância de cada uma das formas de CD45RB no mecanismo de ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar o papel do timo na troca das populações linfocitárias que ocorrem com a administração de anti-CD45RB. Sabe-se que animais que tem seu timo removido, apresentam um maior número de linfócitos CD45RB^{Low} e um menor número de células jovens, imaturas (CD45RB^{High}) na circulação periférica. Postulou-se que se evitasse a entrada dos linfócitos CD45RB^{High} para a circulação periférica através da eliminação de sua fonte principal (o timo), um aumento da sobrevida do enxerto seria atingida. Assim, sabendo-se que linfócitos “virgens” provenientes do timo expressam em sua maioria o fenótipo CD45RB^{High} CTLA-4⁻, timentomias foram realizadas 7 dias antes do tratamento *standard* com anti-CD45RB para que se evitasse a migração das células virgens (CD45RB^{High} CTLA-4⁻) para a circulação periférica e órgãos linfóides. A análise da expressão das formas de CD45RB demonstrou, conforme o esperado, que nesta situação também ocorre uma

alteração da forma prevalente, com predomínio da forma $CD45RB^{Low}$. Ao mesmo tempo, a expressão de CTLA-4 não sofre alteração, apresentando também um aumento rápido e uma diminuição progressiva. Contudo, diferente do que foi achado em camundongos que não tiveram o timo removido, os linfócitos $CD4^+$ não apresentaram um retorno da expressão das formas de $CD45RB$ e CTLA-4 aos níveis basais no dia 17 após tratamento. Na verdade, o retorno da expressão de $CD45RB^{Low}$ e CTLA-4 aos níveis basais apresenta um atraso devido a remoção do timo. Mesmo assim, a expressão das formas de $CD45RB$ e de CTLA-4 retornam ao nível basal uma semana mais tarde, no dia 24 após início do tratamento. Embora se acreditasse, previamente a realização deste experimento, que os linfócitos poderiam ficar desviados para o fenótipo $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$ indefinidamente, o atraso do retorno das formas de $CD45RB$ e CTLA-4 aos níveis basais demonstrou que o timo é um controlador parcial da origem de linfócitos $CD4^+CD45RB^{High}CTLA-4^-$, tornando provável que o restante das células $CD4^+CD45RB^{High}CTLA-4^-$ sejam provenientes da conversão periférica de linfócitos $CD4^+CD45RB^{Low}CTLA-4^+$.

Para que se testasse a ocorrência de conversão periférica e se a ausência parcial de linfócitos $CD4^+CD45RB^{High}CTLA-4^-$, promovida pela retirada prévia do timo, afetaria a sobrevida do aloenxerto, camundongos diabéticos tiveram seus timos removidos uma semana antes de receberem tratamento com anti- $CD45RB$ e transplante de ilhotas de Langerhans. Conforme demonstrado em camundongos que não sofreram remoção do timo, todos os animais que não receberam tratamento apresentaram rejeição ao aloenxerto na segunda semana de pós-operatório. Os camundongos tratados com anti- $CD45RB$ apresentaram maior sobrevida do enxerto em relação ao grupo controle. Camundongos que receberam tratamento com anti- $CD45RB$ e prévia remoção do timo não apresentaram rejeição ao aloenxerto até o dia 35, diminuindo assim os episódios de rejeição precoce. No entanto, a ocorrência de rejeição tardia contrariou a idéia de que a remoção de linfócitos $CD4^+CD45RB^{High}CTLA-4^-$ seria capaz de aumentar a sobrevida do enxerto.

A maneira como foi testado papel do timo na cinética das formas de

CD45RB foi inédita. Embora já tenha sido descrito o papel do timo na função de outras subpopulações linfocitárias, ainda não se havia testado o efeito da remoção do timo após administração de anti-CD45RB. Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que o timo exerce papel importante no controle das trocas das formas de CD45RB, como fornecedor de linfócitos jovens que ainda não encontraram o antígeno (CD45RB^{High}). Porém, o fato de a remoção não promover ausência completa de linfócitos CD45RB^{High} na circulação periférica e não prolongar a sobrevivência do enxerto apenas na fase inicial ocorre porque boa parte dos linfócitos CD45RB^{High} é originário da conversão periférica de linfócitos CD45RB^{Low}.

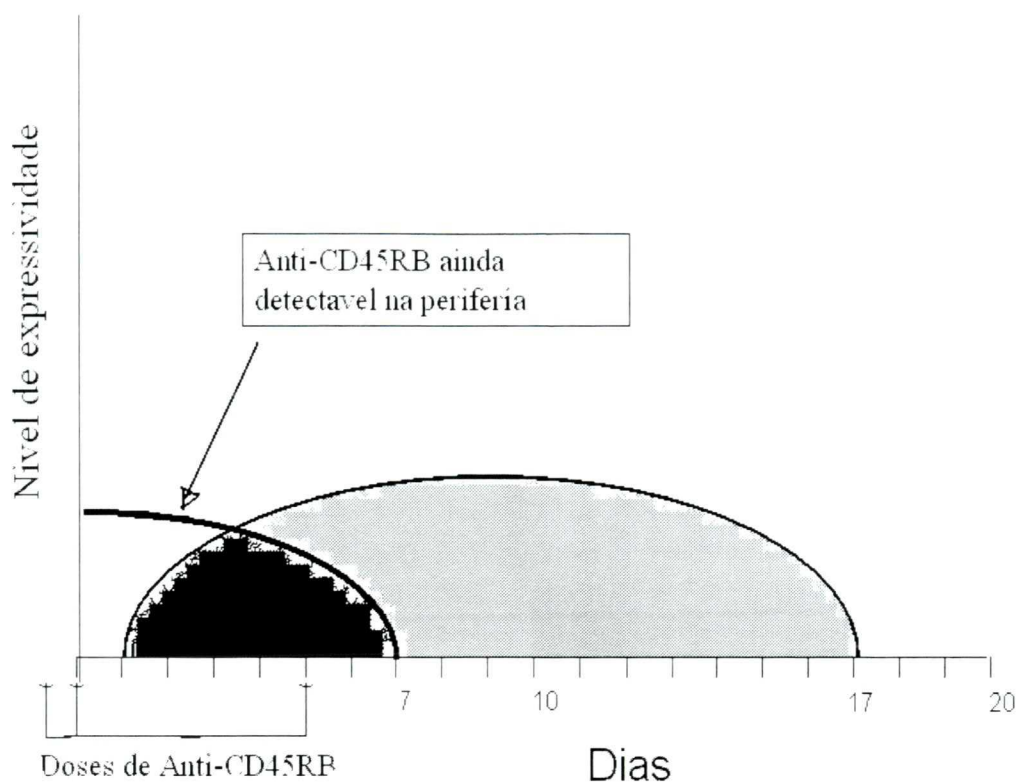
Também foi testado o papel das diferentes formas de CD45RB na rejeição ou aceitação do enxerto mesmo na ausência da exposição ao antígeno do doador. Para isto, realizaram-se transplante de ilhotas de Langerhans em um ambiente rico em linfócitos CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺, ou CD4⁺CD45RB^{High}CTLA-4⁻ gerados após tratamento com anti-CD45RB, para que se comprovasse o papel destas populações linfocitárias na ausência da exposição ao antígeno do doador. Foi assim desenvolvido um modelo experimental de transplante de ilhotas de Langerhans e uso de anti-CD45RB em que se postergava o implante do aloenxerto, verificando-se o exato papel destas diferentes populações linfocitárias na rejeição ou aceitação do enxerto. Receptores foram tratados com dose *standard* de anti-CD45RB nos dias -1, 0 e 5. Receberam o enxerto em tempos diferentes, em quais se conheciam previamente o fenótipo dos linfócitos CD4⁺ com os resultados dos estudos de cinética das formas de CD45RB e CTLA-4 realizados previamente. Este modelo experimental em que se postergava o implante do aloenxerto também foi inédito e pode demonstrar claramente a diferença de cada uma destas subpopulações linfocitárias. Conforme esperado, os animais que receberam o enxerto no dia 18, quando a expressão das formas de CD45RB e CTLA-4 já retornaram aos níveis basais, rejeitaram os aloenxertos como se não tivessem recebido tratamento prévio. Camundongos que tiveram seu transplante postergado até o dia 10, quando a expressão de CTLA-4 é máxima e ainda há prevalência de linfócitos CD45RB^{Low} na circulação periférica, também rejeitaram o

enxerto de maneira precoce em sua maioria, sendo que somente 10% dos animais apresentaram sobrevida longa do aloenxerto. Um achado importante foi que se o transplante fosse postergado até o dia 7, quando CTLA-4 ainda está aumentando e já há um predomínio de linfócitos CD45RB^{Low} na circulação periférica, os camundongos ainda seriam capazes de apresentar uma maior sobrevida do aloenxerto (por mais de 120 dias em 33% dos animais). Vale destacar que conforme os achados de Basadonna et al (1998) e Freitas (2000) no dia 7 após tratamento (48 horas após última dose de anti-CD45RB) não houve detecção de anticorpo residual na circulação periférica e na superfície linfocitária^{11,29}.

Torna-se assim evidente com o resultado destes experimentos que a subpopulação linfocitária que apresenta o fenótipo CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺ é a responsável pela melhoria da sobrevida do aloenxerto com a utilização de anti-CD45RB, mesmo na ausência de exposição ao antígeno do doador.

Foi intrigante a não reprodutibilidade dos resultados adquiridos com o tratamento *standard* com anti-CD45RB nos animais que tiveram seu transplante postergado até o dia 10 (momento no qual a subpopulação linfocitária que apresenta o fenótipo CD4⁺CD45RB^{Low}CTLA-4⁺ é mais prevalente). Tornou-se assim possível a existência de fatores adicionais que pudessem exercer um papel decisivo durante a “janela imunológica”, no período quando a expressão de CTLA-4 está aumentada e há uma predominância de linfócitos CD4⁺CD45RB^{Low} na circulação periférica (representado em cinza na Figura 14).

FIGURA 14 – “JANELA IMUNOLÓGICA” APÓS O TRATAMENTO COM ANTI-CD45RB



Já que não houve detecção de anticorpo residual na circulação periférica, formulou-se a hipótese de que uma exposição ao antígeno, seria o elo para a obtenção de resultados satisfatórios com o uso do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Vale ressaltar que nesta situação, o antígeno seria do doador já que não há a presença de anti-CD45 residual no sangue periférico.

A utilização de transfusão de antígenos do doador (DST) é capaz de gerar tolerância imunológica e uma melhoria da sobrevida do enxerto em uma série de modelos experimentais em camundongos e primatas ^{41,86,125}. Contudo, em outros modelos experimentais, especialmente com a utilização de transplante de ilhotas de Langerhans não há uma melhoria na sobrevida do enxerto, podendo inclusive acontecer uma deterioração mais rápida do enxerto, através de um processo de rejeição

hiperaguda ao aloenxerto^{44,91,117}.

Assim, para se testar a importância da exposição ao antígeno do doador, optou-se por um modelo de DST com implante de 50 ilhotas de Langerhans específicas dos doadores camundongos BALB/c no espaço subcapsular do rim direito dos receptores (no dia zero) e se postergou o transplante do aloenxerto até o dia 10, para que se pudesse utilizar animais do grupo XIII como “controle”. Os camundongos que foram expostos ao antígeno do doador obtiveram um aumento da sobrevida do enxerto em 60% dos animais do grupo, enquanto que somente 10% dos animais do grupo que não foram expostos ao antígeno apresentaram enxerto funcionando até o dia 120. Nenhum dos animais que foram expostos a um antígeno inespecífico foram capazes de manter seus enxertos funcionando até o dia 120. Desta maneira, torna-se evidente que a exposição ao antígeno do doador é um fator fundamental e necessário ao aumento de sobrevida do aloenxerto mediado pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB em um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans. Ao mesmo tempo, a simples exposição ao antígeno não foi suficiente para que se prolongasse a sobrevida do enxerto.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, obtiveram-se as seguintes conclusões:

A) “... a subpopulação linfocitária que apresenta o fenótipo $CD4+CD45RB^{Low}CTLA-4+$ é a responsável pela melhoria da sobrevida do aloenxerto?.” Esta subpopulação é a responsável pela melhora da sobrevida do aloenxerto de ilhotas de Langerhans mediada pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB. A ação do anticorpo provavelmente é devida a uma combinação de alterações imunológicas das quais destacam-se o aumento da expressão da molécula CTLA-4 aliada a exposição ao antígeno do doador.

B) “.. por quanto tempo esta alteração da população linfocitária persiste?”. A cinética das alterações imunológicas geradas pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB é temporária e dura 16 dias após o início do tratamento e implante do enxerto (doses nos dias -1, 0 e 5). As alterações das formas de CD45RB e da expressão de CTLA-4 são também concomitantes.

C) “(quais são) ... os efeitos da administração de múltiplas doses de anti-CD45RB?” O uso de múltiplas injeções de anti-CD45RB é capaz de re-alterar as formas de CD45RB, gerando linfócitos $CD4+CD45RB^{Low}$; porém, por meio de CTLA-4. Não se demonstrou vantagem a longo prazo com a utilização de um regime de múltipla redosagem de anti-CD45RB, sendo que a eficácia do mesmo foi sistivamente desconhecida não é capaz de reinduzir um aumento da expressividade imune evidente até o dia 30 de pós-operatório.

D) “ (qual é)o papel do timo na troca das populações linfocitárias que ocorrem com a administração de anti-CD45RB?” . O timo apresentou um mecanismo de regulação parcial

das formas de CD45RB, como fonte de origem dos linfócitos $CD4^+CD45RB^{High}$. O restante desta subpopulação origina-se da conversão periférica de linfócitos $CD4^+CD45RB^{Low}$. Camundongos submetidos a timectomia demonstraram uma menor taxa de rejeição até o dia 30 de pós-operatório, sem aumento da sobrevida do enxerto a longo prazo.

E) “ (qual é) a importância e eficácia da exposição ao antígeno do doador no mecanismo de ação de anti-CD45RB?”. Durante a janela imunológica onde as formas de CD45RB estão invertidas e a expressão de CTLA-4 está aumentada, a exposição ao antígeno do doador é fator fundamental, e necessário (porém, não suficiente) para que se aumente a sobrevida do enxerto de ilhotas de Langerhans.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABNT. **NBR 6023: informação e documentação: referências-elaboração**. Rio de Janeiro-RJ, 2000
- 2 ALEGRE, M.L.; FRAUWIRTH, K.A.; THOMPSON, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Rev. Immunol.**, v.1, n.3, p. 220-228, 2001.
- 3 ALEGRE, M. L.; NOEL, P. J.; EISFELDER, B. J.; *et al.* Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. **J. Immunol.** , v.157, n.11, p. 4762-4770, 1996.
- 4 ALLEN, C.; LECAIRE, T.; PALTA, M.; *et al.* Risk factors for frequent and severe hypoglycemia in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.24, n.11, p.1878-1881, 2001.
- 5 AVMA. Report of the AVMA Panel of Euthanasia. **JAVMA**, v.218, n.5, p.669-696, 2001.
- 6 AUCHINCLOSS, H. J. Minireview: In search of the elusive holy grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance.**Am. J. Transplantation**, v.1, n.1, p.6-12, 2001.
- 7 AUERSVALD, L. A.; ROTHSTEIN, D. M.; OLIVEIRA, S. C.; *et al.* Anti-CD45RB treatment prolongs islet allograft survival in mice. **Transplant. Proc.**, v.29, n.1-2, p.771, 1997.
- 8 BALLINGER, W. F.; LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery**, v.72, n.2, p.175-186, 1972.
- 9 BANTING, F.G.; BEST; C.H.; COLLIP; J.B.; *et al.* Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Can. Med. Assoc. Journal**, v.12, n.1, p.41-146, 1922.
- 10 BASADONNA, G. P.; MATAS, A. J.; GILLINGHAM, K. J.; *et al.* Relationship between early vs late acute rejection and onset of chronic rejection in kidney transplantation. **Transplant Proc.**, v.25, n.1 Pt 2, p.910-911, 1993.
- 11 BASADONNA, G. P.; AUERSVALD, L.; KHUONG, C. Q.; *et al.* Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.** , v.95, n.7, p.3821-3826, 1998.
- 12 BELL, E. B.; SPARSHOTT, S. M.; BUNCE, C. CD4+ T cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen--a unifying concept. **Immunol. Today**, v.19, n.2, p.60-64, 1998.
- 13 BENSLEY, R. Studies on the pancreas of the guinea pig. **Am. J. Anatomy**, v.12, n.3, p.297-388, 1911.
- 14 BERKE, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.735-773, 1994.
- 15 BONNEVIE-NIELSEN, V.; SKOVGAARD, L. T.; LERNMARK, A. beta-Cell function relative to islet volume and hormone content in the isolated perfused mouse pancreas. **Endocrinology**, v.112, n.3, p.1049-1056, 1983.

- 16 BOTTOMLY, K.; LUQMAN, M.; GREENBAUM, L.; *et al.* A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v.19, n.4, p.617-623, 1989.
- 17 BRETZEL, R. G. Current status and perspectives in clinical islet transplantation. **J Hepatobiliary Pancreat. Surg.**, v.7, n.4, p.370-373, 2000.
- 18 CHAMBERS, C. A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. **Trends. Immunol.**, v.22, n.4, p.217-223, 2001.
- 19 CHAMBERS, C. A.; KUHNS, M. S.; EGEN, J. G.; *et al.* CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p.565-594, 2001.
- 20 CHANG, H. L.; LEFRANCOIS, L.; ZAROUKIAN, M. H.; *et al.* Developmental expression of CD45 alternate exons in murine T cells. Evidence of additional alternate exon use. **J. Immunol.**, v.147, n.5, p.1687-1693, 1991.
- 21 CRYER, P. E. Hypoglycemia risk reduction in type 1 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.109, Suppl, p. S412-S423, 2001.
- 22 DANTAL, J.; HOURMANT, M.; CANTAROVICH, D.; *et al.* Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. **Lancet**, v.351, n.9103, p.623-628, 1998.
- 23 DENGLER, T. J.; SZABO, G.; SIDO, B.; *et al.* Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. **Transplantation**, v.67, n.3, p.392-398, 1999.
- 24 DUSTIN, M. L.; SHAW, A. S. Costimulation: building an immunological synapse. **Science**, v.283, n.5402, p.649-650, 1999.
- 25 THE EFFECT of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **N. Engl.J. Med.**, v.329, n.14, p.977-986, 1993.
- 26 FARNEY, A. C.; CHO, E.; SCHWEITZER, E. J.; *et al.* Simultaneous cadaver pancreas living-donor kidney transplantation: a new approach for the type 1 diabetic uremic patient. **Ann. Surg.**, v.232, n.5, p.696-703, 2000.
- 27 FECTEAU, S.; BASADONNA, G. P.; FREITAS, A.; *et al.* CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. **Nat. Immunol**, v. 2, n. 1, p.58-63, 2001.
- 28 FERGUSON, S. C.; STRACHAN, M. W.; JANES, J. M.; *et al.* Severe hypoglycaemia in patients with type 1 diabetes and impaired awareness of hypoglycaemia: a comparative study of insulin lispro and regular human insulin. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v.17, n.4, p.285-291, 2001.
- 29 FREITAS, A. C. T. **Imunomodulação com o anticorpo monoclonal Anti-CD45RB no transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos.** Curitiba: Tese (Doutor em Clínica Cirúrgica), Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, 2000.
- 30 GAO, Z.; ZHONG, R.; JIANG, J.; *et al.* Adoptively transferable tolerance induced by CD45RB monoclonal antibody. **J. Am. Soc.Nephrol.**, v.10, n.2, p.374-381, 1999..

- 31 GAYET, R. G., M. La regulation de la sécrétion interne pancreatique par un processus humoral, démontrée par des transplantations de pancréas. Expériences sur des animaux dépancreatés. **Compte Rendus de la Société de Biologie de Paris**, 63, 1615-1618, 1927.
- 32 GINNS, L. C.; COSIMI, A.B; MORRIS, P. J. **Transplantation**. London: Blackwell Sciences Inc, 1999.
- 33 GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T.; *et al.* An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. **Transplantation**, v.40, n.4, p.437-438, 1985.
- 34 GRUESSNER, A. C.; SUTHERLAND, D. E. Pancreas transplant outcomes for United States (US) cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of October, 2000. **Clin.Transpl.**, p.45-72, 2000.
- 35 HABEL, R. E.; FREWEIN, J.; SACK, W. O., *et al.* **Nomina Anatomica Veterinaria**. Zurich: World Association of Veterinary Anatomists, 1994.
- 36 HARA, M.; KINGSLEY, C. I.; NIIMI, M.; *et al.* IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. **J. Immunol.**, v.166, n.6, p.3789-3796, 2001.
- 37 HARPER, K.; BALZANO, C.; ROUVIER, E.; *et al.* CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **J. Immunol.**, v.147, n.3, p.1037-1044, 1991.
- 38 HATHCOCK, K. S.; LASZLO, G.; DICKLER, H. B.; *et al.* Expression of variable exon A-, B-, and C-specific CD45 determinants on peripheral and thymic T cell populations. **J. Immunol.**, v. 148, n.1, p.19-28, 1992.
- 39 HELDERMAN JH, G., S. Transplantation Immunobiology. In: DANOVITCH, G.M., ed. **Handbook of kidney transplantation**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001.p.17-38.
- 40 HELLESTROM, C. A method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals. **Acta Endocrinol.**, v.45, p.122-132, 1964.
- 41 IWAKOSHI, N. N.; MORDES, J. P.; MARKEES, T. G.; *et al.* Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. **J. Immunol.**, v.164, n.1, p.512-521, 2000.
- 42 KAUFMAN, D. B.; LEVENTHAL, J. R.; KOFFRON, A. J.; *et al.* A prospective study of rapid corticosteroid elimination in simultaneous pancreas-kidney transplantation: comparison of two maintenance immunosuppression protocols: tacrolimus/mycophenolate mofetil versus tacrolimus/sirolimus. **Transplantation**, v. 73, n.2, p.169-177, 2002.
- 43 KELLY, W. D.; LILLEHEI, R. C.; MERKEL, F. K.; *et al.* Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. **Surgery**, v.61, n.6, p.827-837, 1967.
- 44 KIMURA, F.; GOTOH, M.; TANAKA, T.; *et al.* Effects of locally expressed CTLA4-Ig in a pancreatic beta cell line on the accelerated graft rejection response induced by DST. **Transplant. Proc.**, v.33, n.1-2, p.552, 2001.

- 45 KINGSLEY, C. I.; KARIM, M.; BUSHELL, A. R.; *et al.* CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10- dependent immunoregulation of alloresponses. **J. Immunol.**, v.168, n.3, p.1080-1086, 2002.
- 46 KLAUSNER, R. D.; SAMELSON, L. E. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. **Cell**, v.64, n.5, p.875-878, 1991.
- 47 KLONOFF, D. C. Noninvasive blood glucose monitoring. **Diabetes Care**, v.20, n.3, p.433-437, 1997.
- 48 KO, S.; JAGER, M. D.; TSUI, T. Y.; *et al.* Long-term allograft acceptance induced by single dose anti-leukocyte common antigen (RT7) antibody in the rat. **Transplantation**, v.71, n.8, p.1124-1131, 2001.
- 49 KORETZKY, G. A.; PICUS, J.; THOMAS, M. L.; *et al.* Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. **Nature**, v.346, n.6279, p.66-68, 1990.
- 50 KORETZKY, G. A.; PICUS, J.; SCHULTZ, T.; *et al.* Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A**, v.88, n.6, p.2037-2041, 1991.
- 51 KORETZKY, G. A.; KOHMETSCHER, M. A.; KADLECK, T.; *et al.* Restoration of T cell receptor-mediated signal transduction by transfection of CD45 cDNA into a CD45-deficient variant of the Jurkat T cell line. **J. Immunol.**, v.149, n.4, p.1138-1142, 1992.
- 52 KOZIERADZKI, I.; KUNDIG, T.; KISHIHARA, K.; *et al.* T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45. **J. Immunol.**, v.158, n.7, p.3130-3139, 1997.
- 53 KRALE, L.P.; Levine, R.; BARNETT, D.M. The history of diabetes. In: KAHN, C.R.; WEN, G.C. **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Febeger, 1993.p.1-14.
- 54 LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, n.1, p.35-39, 1967.
- 55 LAZAROVITS, A. I.; POPPEMA, S.; ZHANG, Z.; *et al.* Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. **Nature**, v.380, n.6576, p.717-720, 1996.
- 56 LEE, W. T.; YIN, X. M.; VITETTA, E. S. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v.144, n. 9, p.3288-3295, 1990.
- 57 LEITENBERG, D.; NOVAK, T. J.; FARBER, D.; *et al.* The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. **J. Exp. Med.**, v.183, n.1, p.249-259, 1996.55
- 58 LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.233-258, 1996.
- 59 LEUNG, H. T.; BRADSHAW, J.; CLEAVELAND, J. S.; *et al.* Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86,

- contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n.42, p.25107-25114, 1995.
- 60 LILLEHEI, R. C.; IDEZUKI, Y.; UCHIDA, H.; *et al.* Pancreatic allotransplantation in the dog and in man. **Br. J. Surg.**, v.56, n. 9, p.699, 1969.
- 61 LINETSKY, E.; BOTTINO, R.; LEHMANN, R.; *et al.* Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. **Diabetes**, v.46, n.7, p.1120-1123, 1997.
- 62 LINSLEY, P. S.; BRADY, W.; URNES, M.; *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **J. Exp. Med.**, v.174, n.3, p.561-569, 1991.
- 63 LINSLEY, P. S.; BRADSHAW, J.; GREENE, J.; *et al.* Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. **Immunity**, v.4, n.6, p.535-543, 1996.
- 64 LUHDER, F.; HOGLUND, P.; ALLISON, J. P.; *et al.* Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. **J. Exp. Med.**, v.87, n.3, p.427-432, 1998.
- 65 MADRENAS, J.; CHAU, L. A.; SMITH, J.; *et al.* The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. **J. Exp. Med.**, v.185, n.2, p.219-229, 1997.
- 66 MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat. Immunol.**, v.2, n.9, p.816-822, 2001.
- 67 METZ, D. P.; FARBER, D. L.; TAYLOR, T.; *et al.* Differential role of CTLA-4 in regulation of resting memory versus naive CD4 T cell activation. **J. Immunol.**, v.161, n.11, p.5855-5861., 1998.
- 68 MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.5, p.342-353, 1965.
- 69 NAJAFIAN, N.; SAYEGH, M. H. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v.9, n.9, p.2147-2157, 2000.
- 70 NAJARIAN, J. S.; SUTHERLAND, D. E.; MATAS, A. J.; *et al.* Human islet transplantation: a preliminary report. **Transplant. Proc.**, v.9, n.1, p.233-236, 1977..
- 71 NATHAN M.J.; YIAN, D., EICHWALD E.J., *et al.* The immunobiology of inductive anti-CD40L therapy in transplantation: allograft acceptance is not dependent upon the deletion of graft-reactive T cells. **Am. J. Transplantation**, v.2, n.4, p.323-332, 2002.
- 72 NEWSTEAD, C. G. Assessment of risk of cancer after renal transplantation. **Lancet**, v.351, n.9103, p.610-611, 1998.
- 73 ONODERA, H.; MOTTO, D. G.; KORETZKY, G. A.; *et al.* Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.36, p.22225-22230, 1996.
- 74 ONODERA, K.; CHANDRAKER, A.; SCHAUB, M.; *et al.* CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in sensitized rat recipients: induction of transplantation tolerance in association with depressed cell-mediated and humoral immune responses. **J. Immunol.**, v. 159, n.4, p.1711-1717, 1997.

- 75 OPELZ, G.; TERASAKI, P. I. Poor kidney-transplant survival in recipients with frozen-blood transfusions or no transfusions. **Lancet**, v.2, n.7882, p.696-698, 1974.
- 76 OZKAYNAK, E.; GAO, W.; SHEMMERI, N.; *et al.* Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. **Nat. Immunol.**, v.2, n.7, p.591-596, 2001.
- 77 PARKER, D. C.; GREINER, D. L.; PHILLIPS, N. E.; *et al.* Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.92, n.21, p.9560-9564, 1995.
- 78 PEREZ, V. L.; VAN PARIJS, L.; BIUCKIANS, A.; *et al.* Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. **Immunity**, v.6, n.4, p.411-417, 1997.
- 79 POWRIE, F.; LEACH, M. W.; MAUZE, S.; *et al.* Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **Int. Immunol.**, v.5, n.11, p.1461-1471, 1993.
- 80 PRINCIPLES for utilization and care of vertebrate animals used in testing research and training. **Code of Federal Regulations of US Government**, v.9, n1, Parts 1-199, 2000.
- 81 RASTELLINI, C; SALAM, A.; KUDDUS, R; *et al.* Prevention of T-cell activation by Rh-CTLA-4-Ig and anti-CD40L monoclonal antibody results in indefinite islet allograft survival. *Transpl. Proc.*, vol. 31, n.1-2, p.1242-1243, 1999
- 82 READ, S; MALMSTROM, V, POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocytes-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **J Exp. Med.**, v. 192, p.295-302, 2000.
- 83 RICORDI, C.; LACY, P. E.; FINKE, E. H.; *et al.* Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**, v.37, n.4, p.413-420, 1988.
- 84 ROBERTSON, R. P.; DAVIS, C.; LARSEN, J.; *et al.* Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. **Diabetes Care**, v.23, n.1, p.112-116, 2000.
- 85 ROGERS, P. R.; PILAPIL, S.; HAYAKAWA, K.; *et al.* CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. **J. Immunol.**, v.148, n.12, p.4054-4065, 1992.
- 86 ROSSINI, A. A.; GREINER, D. L.; MORDES, J. P. Induction of immunologic tolerance for transplantation. **Physiol. Rev.**, v.79, n.1, p.99-141, 1999.
- 87 ROSSINI, A. A.; PARKER, D. C.; PHILLIPS, N. E.; *et al.* Induction of immunological tolerance to islet allografts. **Cell Transplant.**, v.5, n.1, p.49-52, 1996.
- 88 ROTHSTEIN, D.; BASADONNA, G. Anti-CD45: A new approach towards tolerance induction. **Graft**, v.2, n.6, p.239-245, 1999.
- 89 ROTHSTEIN, D. M.; SAITO, H.; STREULI, M.; *et al.* The alternative splicing of the CD45 tyrosine phosphatase is controlled by negative regulatory trans-acting splicing factors. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n.10, p.7139-7147, 1992.
- 90 ROTHSTEIN, D. M.; LIVAK, M. F.; KISHIMOTO, K.; *et al.* Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term

- engraftment and tolerance in stringent transplant models. **J. Immunol.**, v.166, n.1, p.322-329, 2001.
- 91 ROY-CHAUDHURY, P.; NICKERSON, P. W.; MANFRO, R. C.; *et al.* CTLA4Ig attenuates accelerated rejection (presensitization) in the mouse islet allograft model. **Transplantation**, v.64, n.1, p.172-175, 1997.
- 92 RUDD, C. E.; MARTIN, M.; SCHNEIDER, H. CTLA-4 negative signaling via lipid rafts: A new perspective. **Sci. STKE.**, v.128, p.E18, 2002.
- 93 SALOMON, B.; LENSCHOW, D. J.; RHEE, L.; *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity**, v.12, n.4, p.431-440, 2000.
- 94 SALVALAGGIO, P. R. O. DENG, S.; ARIYAN, C.E.; *et al.* Islet filtration: A simple and rapid new purification procedure that avoids Ficoll and improves islet mass. **Transplantation**, v.74, n.6, p.877-879, 2002.
- 95 SAYEGH, M. H.; TURKA, L. A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. **N. Engl. J. Med.**, v.338, n.25, p.1813-1821, 1998.
- 96 SCHARP, D. W.; MARCHETTI, P.; SWANSON, C.; *et al.* The effect of transplantation site and islet mass on long-term survival and metabolic and hormonal function of canine purified islet autografts. **Cell Transplant.**, v.1, n.2-3, p.245-254, 1992.
- 97 SCHARP, D. W.; LACY, P. E.; SANTIAGO, J. V.; *et al.* Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients. **Transplantation**, v.51, n.1, p.76-85, 1991.
- 98 SCHONRICH, G.; KALINKE, U.; MOMBURG, F.; *et al.* Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. **Cell**, v.65, n.2, p.293-304, 1991.
- 99 SCHWARTZ, R. H. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. **Cell**, v.71, n.7, p.1065-1068, 1992.
- 100 SCHWARTZ, R. H. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? **J. Exp. Med.**, v.184, n.1, p.1-8, 1996.
- 101 SCHWARTZ, R. S. The new immunology--the end of immunosuppressive drug therapy? **N. Engl. J. Med.**, v.340, n.22, p.1754-1756, 1999.
- 102 SHAPIRO, A. M.; LAKEY, J. R.; RYAN, E. A.; *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N. Engl. J. Med.**, v.343, n.4, p.230-238, 2000.
- 103 SHAPIRO, M. E.; LIU, M. Prolongation of islet allograft survival by anti-CD45 antibody pretreatment. **Transplant. Proc.**, v.27, n.1, p.613-614, 1995.
- 104 SHARPE, A.H.; POWRIE, F. G. The B7-CD28 superfamily. **Nature Rev. Immunol.**, v.2, n.2, p.116-126, 2002.
- 105 SHIRAISHI, T.; YASUNAMI Y., TAKEHARA M.; *et al.* Prevention of acute lung allograft rejection in rat by CTLA4Ig. **Am. J. Transplantation**, v. 2, n.3, p.223-228, 2002.

- 106 SHIRATORI, T.; MIYATAKE, S.; OHNO, H.; *et al.* Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. **Immunity**, v.6, n.5, p.583-589, 1997.
- 107 SJODIN, K.D.A.P.; SMITH, J.M.; MARTINEZ, C. Thymectomy in newborn and adult mice. **Transplantation**, v.1, n.4, p.521-525, 1963.
- 108 SOLLINGER, H. W.; ODORICO, J. S.; KNECHTLE, S. J.; *et al.* Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants. **Ann. Surg.**, v.228, n.3, p.284-296, 1998.
- 109 SPARSHOTT, S. M.; BELL, E. B. Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic in vivo. **Eur. J. Immunol.**, v.24, n.11, p.2573-2578, 1994.
- 110 SUTHERLAND, D. E.; GRUESSNER, R. W.; GRUESSNER, A. C. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. **World J. Surg.**, v.25, n.4, p.487-496, 2001.
- 111 SUTHERLAND, D. E.; GRUESSNER, R. W.; DUNN, D. L.; *et al.* Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. **Ann. Surg.**, v.233, n.4, p.463-501, 2001.
- 112 TARUMI, K.; MURAKAMI, M.; YAGIHASHI, A.; *et al.* CTLA4IgG treatment induces long-term acceptance of rat small bowel allografts. **Transplantation**, v.67, n.4, p.520-525, 1999.
- 113 TIVOL, E. A.; BORRIELLO, F.; SCHWEITZER, A. N.; *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**, v.3, n.5, p.541-547, 1995.
- 114 TRAN, H. M.; NICKERSON, P. W.; RESTIFO, A. C.; *et al.* Distinct mechanisms for the induction and maintenance of allograft tolerance with CTLA4-Fc treatment. **J. Immunol.**, v.159, n.5, p.2232-2239, 1997.
- 115 TROWBRIDGE, I. S.; THOMAS, M. L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.85-116, 1994
- 116 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba:: Editora UFPR, 2001.
- 117 VAN DER VLIET, J. A.; VAN DER HEM, L. G.; FIELD, M. J.; *et al.* Failure to prolong pancreatic islet allograft survival in rats with donor-specific blood transfusions and immunosuppression. **Transpl Int**, v.1, n.3, p.146-148, 1988.
- 118 VELASCO, A.; HENDRICKS, L.; MOREMEN, K. W.; *et al.* Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II. **J. Cell Biol.**, v.122, n.1, p.39-51, 1993.
- 119 WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J. M.; TIMMS, E.; *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. **Science**, v.270, n.5238, p.985-988, 1995.
- 120 WEISS, A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. **Cell**, v.73, n.2, p.209-212, 1993.

- 121 WELLS, A. D.; LI, X. C.; LI, Y.; *et al.* Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. **Nat. Med.**, v.5, n.11, p.1303-1307, 1999.
- 122 WOODWARD, J. E.; BAYER, A. L.; CHAVIN, K. D.; *et al.* T-cell alterations in cardiac allograft recipients after B7 (CD80 and CD86) blockade. **Transplantation**, v.66, n.1, p.14-20, 1998.
- 123 YU, X.; CARPENTER, P.; ANASETTI, C. Advances in transplantation tolerance. **Lancet**, v.357, n.9272, p.1959-1963, 2001.
- 124 ZHENG, X.; LI, Y.; LI, T; *et al.* Blockade of CD40L/CD40 costimulatory pathway in a DST presensitization model of islet allograft leads to a state of Allo-Ag specific tolerance and permits subsequent engraftment of donor strain islet or heart allografts. **Transplant. Proc.**, v.31, n.1-2, p.627-628, 1999.
- 125 ZHENG, X. X.; MARKEES, T. G.; HANCOCK, W. W.; *et al.* CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. **J. Immunol.**, v.162, n.8, p.4983-4990, 1999.

ANEXO

ANTICORPOS E REAGENTES

Solução tampão de fosfato (PBS) foi constituída de: 53,6 gramas de K_2HPO_4 ; 12,8 gramas de KH_2PO_4 ; e 340 gramas de NaCl, diluídos em 4 litros de água bi-destilada. O pH foi ajustado entre 7,2-7,4. A seguir, a solução foi diluída a 1% e estocada a 4°C para uso em todos os experimentos deste trabalho.

A solução de lise de eritrócitos foi constituída por: 8,29 gramas de NH_4Cl ; 1 grama de $KHCO_3$ e; 0,362 gramas de EDTA, diluída em 1 litro de PBS a 1% e estocada a 4°C.

O anticorpo monoclonal anti-CD45RB (HB220, MB23G2) para camundongos foi produzido por técnicas de hibridoma e obtido de Bioexpress Corporation (West Lebanon, NH, EUA), sendo estocado a -80°C e diluído para uso final a 1mg/ ml.

Os anticorpos utilizados para imunofluorescência, adquiridos de BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA), foram: Imunoglobulina G (IgG) de Rato anti-camundongo-*Fluorescein Isothyocianate* (FITC); IgG de Cabra anti-rato (FITC); IgG de rato anti-CD45RB e de camundongo-FITC; IgG de Hamster anti-humana-R-*Phycoerithrin* -PE; IgG de rato anti-CTLA-4 de camunodongo-PE; IgG de rato anti-camundongo-*Cy-Chrome* (Cy) e; IgG de rato anti-CD4 de camundongo-Cy. Os frascos foram mantidos durante toda a fase experimental em câmara escura a 4°C.

Soro bovino e de bezerro foram adquiridos de Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA) e estocados a -20°C.

Saponina foi adquirida de Sigma Corporation (Saint Louis, MO, EUA), estocada em temperatura ambiente e diluída previamente a cada experimento a 0,5% em PBS a 1% para realização de imunofluorescência intra-celular.

Formaldeído a 37% foi adquirido de JT Baker (Phillisburg, NJ, EUA), diluído a 2% em PBS a 1% e estocado a 4°C.

Para anestesia foi utilizado uma mistura de Ketamina 100mg/ml (Ketaset[®], Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IO, EUA) e Xylestesina 20 mg/ml (Anased[®], Lloyd Lab, Shenandoak, IO, EUA). Inicialmente, em ambiente estéril, foram misturados 5,5 ml de Ketamina com 3,1 ml de Xylestesina. A seguir, diluiu-se 1:1 desta solução em PBS a 1% e estocava-se a 4°C.