

# PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS NA REJEIÇÃO AGUDA DO TRANSPLANTE INTESTINAL EM RATOS

André Dong Won LEE<sup>1</sup>, Ulysses RIBEIRO Jr.<sup>1</sup>,  
Venâncio A. F. ALVES<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Pereira CORBETT<sup>2</sup>,  
Sueli NONOGAKI<sup>2</sup> e Joaquim GAMA-RODRIGUES<sup>1</sup>

**RESUMO - Racional** - O transplante de intestino delgado é procedimento cirúrgico em estudo visando sua aplicação no tratamento dos pacientes portadores da síndrome do intestino curto, com vistas à reabilitação oral. Porém a grande barreira se deve à "rejeição" pela grande quantidade de tecido linfóide presente no intestino delgado. **Objetivo** - Avaliar a atuação das citocinas, interleucina-6 e interferon- $\gamma$  em alotransplante heterotópico intestinal. **Material e Métodos** - Realizaram-se 24 alotransplantes intestinais em ratos da raça Brown-Norway (doador) para Lewis (receptor), sendo subdivididos em três subgrupos de oito animais, sacrificados respectivamente no terceiro dia de pós-operatório (Tx<sub>(3)</sub>), no quinto dia de pós-operatório (Tx<sub>(5)</sub>) e no sétimo dia de pós-operatório (Tx<sub>(7)</sub>) para coleta das biopsias dos enxertos intestinais. Enquanto que no grupo isotransplante (C) envolveu oito animais da raça Lewis (doador) para Lewis (receptor), porém neste grupo realizaram-se biopsias seriadas no mesmo animal, sendo subdivididos em três momentos: biopsia no terceiro dia de pós-operatório (C<sub>(3)</sub>), no quinto dia de pós-operatório (C<sub>(5)</sub>) e sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (C<sub>(7)</sub>) para coleta da biopsia. Realizou-se inicialmente análise intragrupo entre os momentos C<sub>(3)</sub>, C<sub>(5)</sub> e C<sub>(7)</sub> para todos os parâmetros de rejeição citados anteriormente, como também para os três subgrupos Tx<sub>(3)</sub>, Tx<sub>(5)</sub> e Tx<sub>(7)</sub>. Posteriormente, realizou-se a análise intergrupo de forma transversal e pareada comparando-se o grupo isotransplante com o grupo alotransplante (C<sub>(3)</sub> com Tx<sub>(3)</sub>; C<sub>(5)</sub> com Tx<sub>(5)</sub> e C<sub>(7)</sub> com Tx<sub>(7)</sub>). **Resultados** - No grupo isotransplante não houve diferença estatisticamente significativa quanto à imunoeexpressão das citocinas estudadas, todavia no grupo alotransplante observou-se que alterações da interleucina-6 e de interferon- $\gamma$  ocorreram a partir do quinto dia de pós-operatório.

**DESCRITORES** - Intestino delgado, transplante. Rejeição de enxerto. Citocinas. Interleucina-6. Interferon gama recombinante. Ratos.

## INTRODUÇÃO

No decorrer dos últimos 20 anos presenciou-se grande entusiasmo em relação aos transplantes de órgãos<sup>(34, 47, 59, 60)</sup> em decorrência do surgimento das novas drogas imunossupressoras (ciclosporina<sup>(7)</sup>, FK 506<sup>(23, 39, 58, 67)</sup> rapamicina<sup>(55)</sup>). Diferentemente do transplante de órgãos sólidos<sup>(55, 69)</sup> (fígado, rim, coração), o do intestino ainda enfrenta grandes obstáculos referentes ao controle imunológico e seu prognóstico continua insatisfatório. Em alguns pacientes resta como última opção terapêutica o transplante intestinal<sup>(13, 18, 34, 47, 61)</sup>, incluindo os doentes portadores da síndrome de intestino curto (SIC)<sup>(17)</sup>, principalmente aqueles nos quais não se pode mais contar com acesso venoso central e os portadores de graves distúrbios metabólicos com o uso da nutrição parenteral prolongada (NPT)<sup>(54)</sup>.

O uso crônico da NPT para tratar a falência intestinal na SIC provoca morbidade importante, acarretando complicações na

caterização venosa, tais como: infecção, sepse, trombose venosa, perda repetida de acesso venoso, além de baixa qualidade de vida pela dependência contínua de atenção de terceiros, internações frequentes, distúrbios psicológicos e elevado custo de tratamento. A mortalidade pode atingir de 5% a 25%<sup>(8, 9, 16, 24)</sup> ao ano. O emprego de NPT prolongada é também causa de falência de diversos órgãos, principalmente do fígado por colestase hepática. Em decorrência de suas graves consequências em outros aparelhos e órgãos, frequentemente, o transplante intestinal é realizado combinado com o de fígado<sup>(8, 9, 16, 24)</sup>.

No Brasil, foram realizados, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), dois casos pioneiros de transplante intestinal por Okumura na década de 60<sup>(43)</sup>. Nessa Faculdade realiza-se pesquisa experimental de transplante de intestino delgado (TID) desde 1971, visando sua aplicação clínica<sup>(12, 14, 62)</sup>. Recentemente realizou-se na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo o

<sup>1</sup>Departamento de Gastroenterologia e <sup>2</sup>Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Dr. André Dong Won Lee – Rua Profª. Carolina Ribeiro, 123 - apt.101 – Vila Mariana – 04116-020 – São Paulo, SP.

primeiro TID, introduzindo entre nós o emprego de FK-560<sup>(6)</sup> para evitar a rejeição nessa modalidade de transplante.

Os pacientes com indicação do TID se distribuem em três categorias: pacientes com falência apenas do intestino, que não mais podem ser mantidos em NPT e recebem TID isolado, pacientes com FI associada à doença hepática avançada, que recebem TID combinado ao transplante hepático, e pacientes com falência de vários órgãos abdominais, que necessitam de transplante multivisceral<sup>(2, 16, 19, 26, 27, 59, 66)</sup>.

O presente estudo foi idealizado para se ampliar o conhecimento sobre métodos de diagnóstico precoce da rejeição intestinal. O reconhecimento de rejeição é difícil, porém, importante pela possibilidade da reversão desse fenômeno biológico, dependendo de seu grau e da precocidade de seu diagnóstico, desde que se faça uso adequado de imunossuppressores antes da perda definitiva do enxerto intestinal<sup>(31, 53)</sup>.

Devido à ausência de marcadores sorológicos específicos, bem como de quadro clínico específico, resta aos cirurgiões recorrer aos recursos de diagnóstico histológico por meio das biopsias. O processo da rejeição manifesta-se histologicamente sob forma de placas distribuídas de maneira descontínua no enxerto intestinal, sendo necessárias várias biopsias de três a cinco amostras por sítio, na tentativa de se obter amostra representativa que permita se firmar o diagnóstico<sup>(68)</sup>. Mesmo com a análise criteriosa da correlação entre as alterações histológicas e rejeição, a positividade do diagnóstico corresponde a apenas 60%\*.

Neste estudo foi avaliado o comportamento da liberação de algumas citocinas<sup>(15, 20, 21, 57, 63, 64)</sup> no tecido transplantado, que poderia ser relacionado ao fenômeno da rejeição aguda.

As citocinas são reguladores da resposta imune e inflamatória. Estão diretamente envolvidas com a proliferação e diferenciação das células da medula óssea e progenitoras dos leucócitos. Encontram-se em grande escala como proteínas solúveis no tecido local afetado e são secretadas diretamente pelas células-alvo. Em relação aos transplantes de órgãos, a expressão e a função das citocinas em cadeia têm atraído a atenção de vários pesquisadores com dois objetivos: primeiro, o diagnóstico precoce da rejeição e segundo, a possibilidade de se elaborar novos imunossuppressores<sup>(39, 40)</sup>.

Visto que o fenômeno da rejeição do enxerto se assemelha ao processo inflamatório, parece ser útil o estudo do papel das citocinas interleucina-6 (IL-6) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), especificamente devido a sua manifestação expressiva em pesquisas voltadas à compreensão de outras formas de reação imunológica<sup>(15, 20, 21, 57, 63, 64)</sup>.

Portanto, o objetivo do presente estudo experimental em ratos submetidos a alotransplante intestinal, foi avaliar o comportamento das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$ , no diagnóstico precoce da rejeição aguda.

## MÉTODO

### Animal de Experimentação

Empregou-se o modelo de transplante intestinal em ratos isogênicos das raças Brown Norway e Lewis, sendo 24 animais machos da raça Brown Norway e 40 animais machos da raça Lewis, com o peso entre 200 a 350 g, distribuídos aleatoriamente, sem prévia seleção ou análise de qualquer parâmetro clínico-laboratorial para quaisquer dos grupos estudados. Os animais Brown Norway foram apenas doadores do intestino delgado e os da raça Lewis, 8 doadores e 32 receptores. Os animais foram anestesiados com pentobarbital (65 mg/kg) e atropina (0,04 mg/kg) via intraperitoneal, seguida de anestesia inalatória com halotano 2% associado a oxigênio (2,5 L/min).

\* Demetris JA. Comunicação pessoal, 1993

Os animais foram distribuídos em dois grupos, a saber:

### Grupo isotransplante (C)

É o grupo controle (C), constituído por oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao isotransplante. O mesmo animal foi submetido a duas biopsias e posteriormente ao sacrifício nos seguintes momentos:

Momento C<sub>(3)</sub> - Os oito animais receptores foram submetidos a biopsia intestinal no terceiro dia pós-operatório (PO3).

Momento C<sub>(5)</sub> - Os oito animais foram submetidos a biopsia intestinal no quinto dia de pós-operatório (PO5).

Momento C<sub>(7)</sub> - Os oito animais foram sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (PO7).

### Grupo Alotransplante (Tx)

Constituído por 24 animais receptores da raça Lewis e 24 animais doadores da raça Brown Norway, distribuídos em três subgrupos descritos a seguir:

Subgrupo Tx<sub>(3)</sub> - Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e que foram sacrificados no terceiro dia de pós-operatório (PO3).

Subgrupo Tx<sub>(5)</sub> - Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e que foram sacrificados no quinto dia de pós-operatório (PO5).

Subgrupo Tx<sub>(7)</sub> - Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e que foram sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (PO7).

### Procedimento cirúrgico

O transplante intestinal foi executado de forma heterotópica (Thiry-Vella) segundo a técnica de LEE<sup>(31)</sup>, ZHONG<sup>(71,72)</sup> e MONCHICK-RUSSELL<sup>(37)</sup>. Não foi utilizada nenhuma forma de imunossupressão (Figura 1)

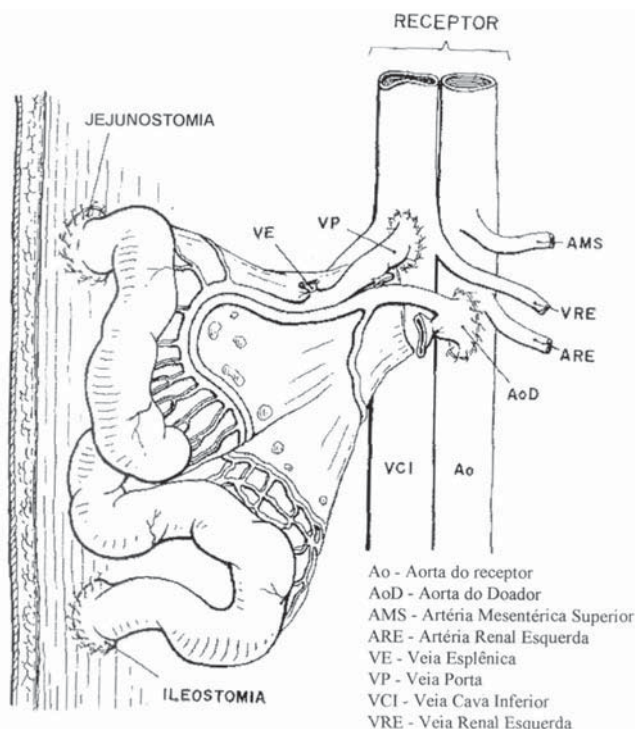


FIGURA 1 – Esquema das posições das anastomoses vasculares; nota-se detalhe da anastomose término-lateral porta-cava e aorto-aórtica



### Imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico foi realizado pela técnica da estreptavidina-biotina peroxidase utilizando-se: a) anticorpo para IFN- $\gamma$  (Rat IFN- $\gamma$  Affinity Purified Polyclonal Antibody, RD Systems, EUA), b) anticorpo para IL-6 (Rat IL-6 Affinity Purified Antibody, RD Systems, EUA).

A avaliação da leitura foi realizada por dois investigadores (UR, ADWL), quantificando-se a intensidade e a distribuição das citocinas em todo corte transversal intestinal presente no corte histológico da lâmina. Seguiu-se método semiquantitativo numa escala de 0 a 4 para intensidade e distribuição, já descrita anteriormente<sup>(48, 50, 51)</sup> (Figuras 2, 3, 4).

### Análise estatística

Os dados foram confrontados com a curva de Gauss (curva normal) e classificados em não-paramétricos (para  $P < 0,05$ ).

Os dados foram analisados de duas formas: intragrupo (dentro de cada grupo de estudos) e intergrupo (comparando os grupos em momentos diferentes).

Na análise intragrupo no grupo isótranplante (C) foi realizado o teste de Friedman com pós-teste de Muller-Dunn (o mesmo animal em diferentes momentos) e no grupo alotranplante (Tx), o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn (animais diferentes em momentos diferentes).

Na análise transversal intergrupo entre os grupos C e Tx foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Os dados foram expressos em mediana e percentil 25 e 75.

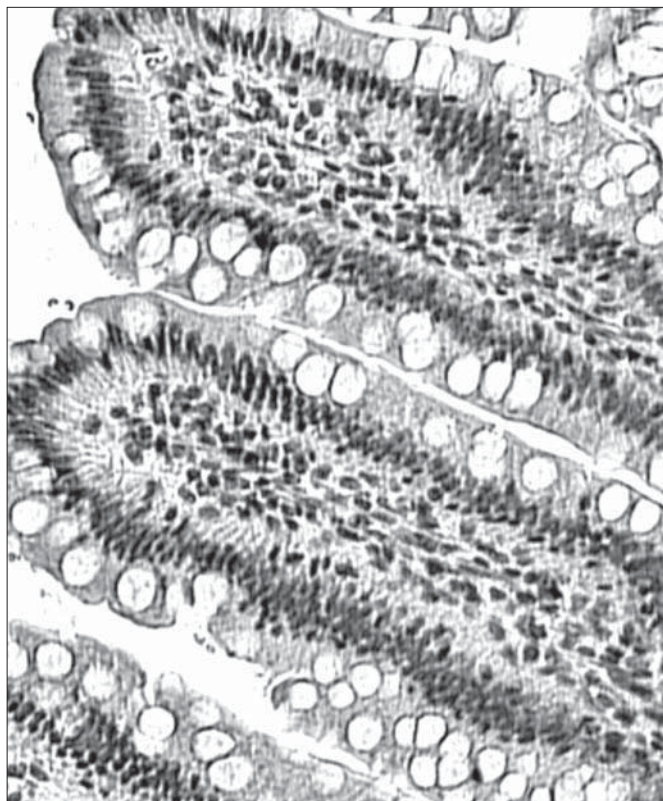


FIGURA 2 – Reação de imuno-histoquímica IL-6 com 400x de aumento do momento C<sub>(3)</sub>

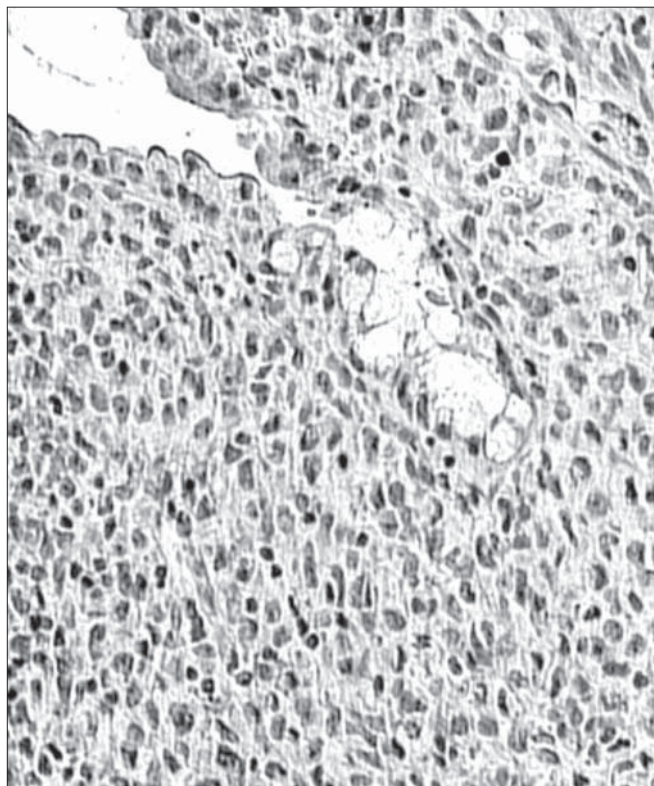


FIGURA 3 – Reação de imunoistoquímica IL-6 com 400x de aumento do subgrupo Tx<sub>7</sub>, caracterizada pela grande presença da citocina notada pela coloração acastanhada

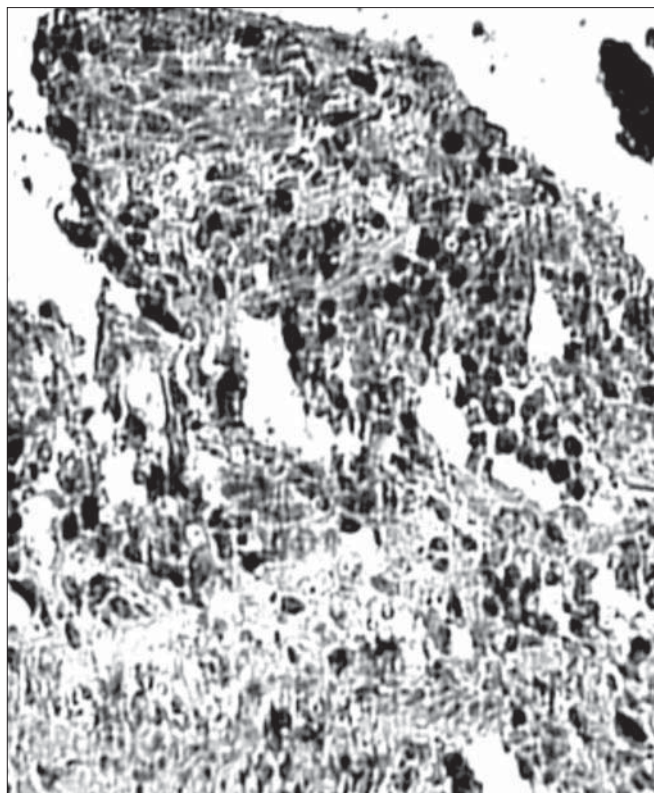


FIGURA 4 – Reação de imuno-histoquímica IFN- $\gamma$  com 400x de aumento do subgrupo Tx<sub>7</sub>, caracterizada pela grande presença da citocina notada pela coloração acastanhada

## RESULTADOS

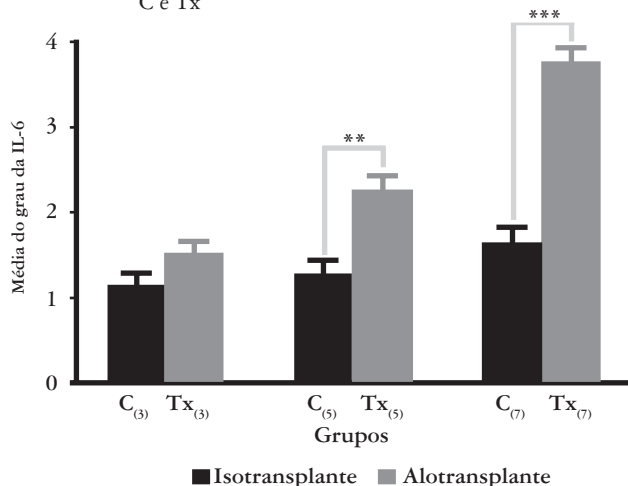
### Avaliação da IL-6

**No Grupo C** – Na análise da IL-6 do grupo C, entre os momentos  $C_{(3)}$ ,  $C_{(5)}$  e  $C_{(7)}$ , não houve diferença estatística entre os mesmos. O grau da IL-6 variou de 0 a 4, segundo sua distribuição e intensidade de coloração, adotada na metodologia.

**No Grupo Tx** – Na análise da IL-6 intragrupo do grupo Tx entre os subgrupos  $Tx_{(3)}$ ,  $Tx_{(5)}$  e  $Tx_{(7)}$ , houve aumento do grau desta citocina de modo marcante do  $Tx_{(3)}$  para  $Tx_{(7)}$ . O mesmo ocorreu do subgrupo  $Tx_{(5)}$  para  $Tx_{(7)}$  com diferença estatística, porém de forma menos acentuada. Enquanto que do subgrupo  $Tx_{(3)}$  para  $Tx_{(5)}$  nada ocorreu.

**Avaliação intergrupo entre o grupo C e Tx** – Na análise da IL-6 intergrupo entre os momentos do grupo C e os subgrupos do grupo Tx, de forma pareada e transversal, observou-se diferença estatística a partir do quinto dia de pós-operatório ( $C_{(5)}$  e  $Tx_{(5)}$ ) com progressão até o sétimo dia de pós-operatório ( $C_{(7)}$  e  $Tx_{(7)}$ ). Porém, em todos os momentos, o grau IL-6 no grupo Tx foi maior em relação ao grupo C (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - Análise transversal da IL-6 intergrupo entre os grupos C e Tx



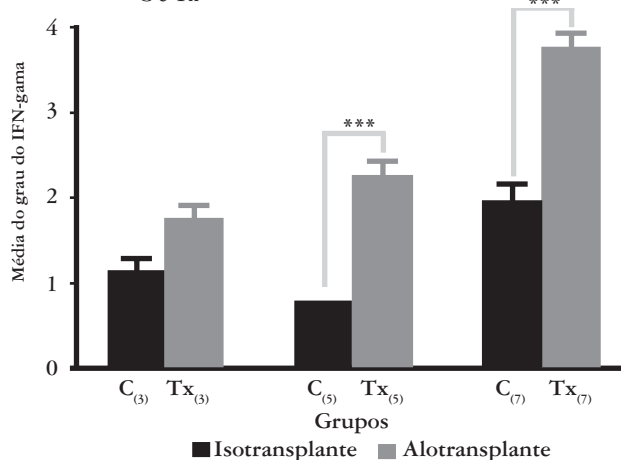
### Avaliação do IFN- $\gamma$

**No grupo C** – Na análise do IFN- $\gamma$  do grupo controle entre os momentos  $C_{(3)}$ ,  $C_{(5)}$  e  $C_{(7)}$ , observou-se diferença estatística apenas entre os momentos  $C_{(5)}$  para  $C_{(7)}$ , caracterizado pelo aumento do grau do IFN- $\gamma$ .

**No grupo Tx** – Na análise do IFN- $\gamma$  no grupo Tx, observou-se diferença estatística marcante no subgrupo  $Tx_{(3)}$  para  $Tx_{(7)}$ , caracterizado pelo aumento do grau do IFN- $\gamma$ .

**Avaliação intergrupo entre os grupos C e Tx** – Na análise da IFN- $\gamma$  intergrupo entre os momentos do grupo C e Tx, de forma pareada e transversal, observou-se diferença estatística marcante a partir do quinto dia de pós-operatório ( $C_{(5)}$  e  $Tx_{(5)}$ ), com progressão até o sétimo dia de pós-operatório ( $C_{(7)}$  e  $Tx_{(7)}$ ). Nota-se que em todos os momentos o grau IFN- $\gamma$  no grupo Tx foi maior em relação ao grupo C (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 - Análise transversal do IFN- $\gamma$  intergrupo entre os grupos C e Tx



## DISCUSSÃO

A vantagem do modelo heterotópico usado nesta pesquisa está na nutrição do animal ser independente da função do intestino enxertado. Sua grande desvantagem é não corresponder ao transplante clínico, devido à participação do intestino transplantado no trânsito intestinal<sup>(31, 71, 72)</sup>. Portanto, no modelo ortotópico, o enxerto fica exposto a vários antígenos externos com alteração do sistema de defesa da mucosa intestinal, afetando a população de linfócitos e ativando a população celular local. Quanto à drenagem venosa (portal versus sistêmica), mostra-se controversa, mas parece que a drenagem portal tem vantagem, oferecendo proteção ao enxerto intestinal pelo tráfego de linfócitos para o fígado<sup>(35, 71, 72)</sup>.

Muitas citocinas apresentam meia-vida curta e exercem seus efeitos localmente, portanto seus níveis em nível sorológico não correspondem a evento ocorrido no enxerto intestinal<sup>(35)</sup>.

Várias citocinas estão implicadas na rejeição do enxerto intestinal, uma vez que o processo da rejeição corresponde ao mecanismo inflamatório. As pró-inflamatórias incluem fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1)<sup>(3)</sup>. Os linfócitos T auxiliares -1 (TH-1) produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotóxina (TNF- $\beta$ ), ao passo que os linfócitos auxiliares-2 (TH-2) produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. As citocinas dos TH-1 podem ser detectadas na rejeição do enxerto e DEVH agudo em estudo experimental e clínico. As citocinas do TH-2 estão ligadas a situações de rejeição e DEVH crônico<sup>(4, 70)</sup>.

Para entender as alterações histológicas e das citocinas no processo da rejeição, é essencial a compreensão da complexa população de linfócitos no intestino delgado. O tecido linfóide intestinal associado (GALT), serve como primeiro mecanismo de defesa frente a vários antígenos externos provenientes da ingestão alimentar. Sabe-se que há diferença funcional e fenotípica entre células linfóides das placas de Peyer, lâmina própria e linfócitos intraepiteliais. Apesar dos linfócitos T serem abundantes no intestino normal em ratos, os linfócitos B e células dendríticas parecem ser células mais importantes apresentadoras de aloantígeno<sup>(33)</sup>. Os linfócitos intraepiteliais, por si só, não ativam os linfócitos T, mas aumentam durante o processo de rejeição<sup>(42)</sup>, parecendo receber co-estimulação dos macrófagos do receptor e permitindo sua participação na ativação da invasão dos linfócitos T<sup>(32)</sup>.

Há evidência de que os mediadores de rejeição no TID é composta por população heterogênea de células com tráfego simultâneo entre linfócitos do hospedeiro e do enxerto<sup>(30)</sup>. Nas descrições clássicas, as



células envolvidas no processo da rejeição dão ênfase à população dos linfócitos T<sup>(56)</sup>, apesar de na rejeição do TID, os macrófagos também apresentarem papel importante neste mecanismo.

CLARK et al.<sup>(5)</sup> e HELL et al.<sup>(22)</sup> demonstraram que no TID em ratos apresentam 50% da mucosa do enxerto infiltrado por macrófagos do hospedeiro e grande número destes infiltrando a submucosa e muscular. Segundo os alguns autores<sup>(10,41,65)</sup>, há grandes alterações na IL-6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  neste modelo de rejeição, originadas principalmente, dos macrófagos e monócitos. Neste estudo foi avaliado apenas a IL-6 e IFN- $\gamma$ , excluindo-se o TNF- $\alpha$ , apesar de ser mediador importante<sup>(44,52)</sup> que amplia o antígeno classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do endotélio<sup>(29)</sup>.

Nesta pesquisa não se optou pela contagem de células positivas por somatória de campos preconizado por REIS et al.<sup>(45,46)</sup> devido ao grande número de células positivas por campo, o que causou dificuldade na contagem destas à microscopia óptica, com aumento de 400x. Portanto, foi adotada apenas a leitura por contagem de distribuição das células positivas<sup>(48,50,51)</sup>.

A análise das citocinas em tecido intestinal transplantado é ainda controverso e pouco estudado<sup>(35)</sup>. A maioria dos autores que estudou a IL-6 o fez pelo método da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (rtPCR)<sup>(14,15,20,35,63,64)</sup>, caracterizada pela alta sensibilidade na detecção de citocinas em relação ao método imunistoquímico preconizado por FORBES<sup>(11)</sup>, que se assemelha ao método utilizado neste estudo.

Optou-se neste trabalho pela avaliação imunistoquímica em tecido parafinado pela clareza da leitura que foi proporcionada em relação ao tecido congelado.

A IL-6 é produzida pelos monócitos, células B, células T, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. A IL-6 pode ser induzida pelo IL-1, TNF- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  com IFN- $\gamma$  e pode ter importância na doença do enxerto versus hospedeiro, estimulando a diferenciação e proliferação das células B e T<sup>(1,28)</sup>.

Não houve diferença estatística entre os subgrupos do grupo-controle, em concordância com os achados de outros autores<sup>(14,15,20,28,63,64)</sup>, observando-se baixo grau de IL-6, o que caracteriza a ausência da rejeição.

No grupo Tx houve aumento progressivo da IL-6 com diferença estatística no decorrer do pós-operatório, correlacionando-se com a progressão da rejeição.

As alterações histológicas e das citocinas no processo da rejeição estão intimamente relacionadas às células imunocompetentes do sistema GALT, que garante a defesa contra os antígenos do meio ambiente<sup>(37,38,63)</sup>.

Os linfócitos intra-epiteliais que vão aumentando em número na rejeição, recebem a co-estimulação dos macrófagos do receptor, desencadeando a ativação das células T<sup>(35,63)</sup>. A IL-6 derivada principalmente dos macrófagos e monócitos, promove o crescimento e diferenciação dos macrófagos e monócitos e pode ser induzida pela IL-1, TNF- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  com IFN- $\gamma$ <sup>(35,36)</sup>.

Neste estudo ocorreu progressão da diferença estatística a partir do PO5 até o PO7 entre o grupo C e Tx, em concordância com o observado por vários autores estudados<sup>(20,21,28,35,63,64)</sup>. Embora se tenha utilizado do método imunistoquímico em tecido parafinado, não houve dificuldade na imunexpressão da IL-6 no presente estudo.

McDIARMID et al.<sup>(35)</sup> observaram aumento da IL-6 a partir do PO5 no grupo alotransplantado, que aumentou progressivamente até o 14º dia PO em relação ao grupo isotransplantado.

HAYASHI et al.<sup>(20,21)</sup> observaram aumento da IL-6 a partir do PO5 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado.

TOOGOOD et al.<sup>(63,64)</sup> observaram aumento da IL-6 a partir do PO3 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado. O estudo da IL-6 foi realizado pelo método de rtPCR, analisando-se o linfonodo

mesentérico e as placas de Peyer, que apresentam forte reação imunológica. Este modelo de análise fica inviável do ponto de vista clínico devido à impossibilidade de se obter linfonodo mesentérico, como também as placas de Peyer devido ao risco da perfuração intestinal.

KOIDE et al.<sup>(28)</sup> observaram aumento da IL-6 a partir do PO5 até o PO11 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado.

Comparou-se o presente estudo com os trabalhos de outros autores<sup>(20,21,28,35,63,64)</sup>, notou-se que a metodologia imunistoquímica utilizada pareceu ser eficaz como indicador da rejeição aguda. Porém ao se avaliar a IL-6 com a histopatologia, parece que esta citocina não apresenta vantagens em relação à histopatologia na detecção precoce da rejeição aguda porque não encontraram-se alterações entre o grupo C e Tx no PO3. Vários estudos mostraram que as alterações histopatológicas da rejeição são evidentes a partir do PO5<sup>(37,38,71,72)</sup>. No entanto, no presente estudo, as alterações da rejeição já são presenciadas a partir do PO3, porém não de forma expressiva.

O IFN- $\gamma$  é conhecido como citocina regulatória e inflamatória, produzido principalmente por células T e NK, desencadeado pelo processo inflamatório da rejeição<sup>(1,28)</sup> e induzido pelos antígenos de superfície classe I e II do MHC<sup>(49)</sup>.

No grupo controle, houve aumento com diferença estatística do grau de IFN- $\gamma$  do subgrupo C<sub>(5)</sub> para C<sub>(7)</sub>, embora não tenha ocorrido o fenômeno da rejeição, em contraposição ao observado por vários autores<sup>(20,21,28,35,63,64)</sup> que não lograram demonstrar o aumento desta citocina nos isotransplantes.

Provavelmente, o grupo C, por ter sofrido várias biopsias na porção ileal, no PO7 a porção distal do enxerto poderia estar comprometida pelo processo inflamatório e pelos sucessivos traumas anteriores nesta região<sup>(25)</sup>.

No grupo Tx, o aumento progressivo do grau de IFN- $\gamma$  no decorrer do pós-operatório, causado pelo fenômeno da rejeição, foi semelhante ao observado por vários autores pesquisados<sup>(28,35,63,64)</sup>.

A comparação entre o grupo C e Tx de forma pareada transversal demonstra com clareza a eficácia desta citocina como indicador da rejeição precoce. Neste estudo somente a partir do PO5 observou-se o aumento do IFN- $\gamma$  com diferença estatística do grupo Tx em relação ao grupo C.

Alguns autores têm observado alterações desta citocina mais precocemente: McDIARMID et al.<sup>(35)</sup> observaram aumento do IFN- $\gamma$  a partir do PO5 até o PO14 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado. HAYASHI et al.<sup>(20,21)</sup> observaram aumento do IFN- $\gamma$  a partir do PO3 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado. TOOGOOD et al.<sup>(63,64)</sup> observaram aumento do IFN- $\gamma$  a partir do PO1 por meio de rtPCR no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado. O tecido analisado foi o linfonodo mesentérico e as placas de Peyer que constituem o sistema GALT apresentando forte reação imunológica. Todavia, este método é muito atraente para detecção precoce da rejeição em tecido fortemente imunocompetente: placas de Peyer e linfonodo mesentérico, porém, de aplicabilidade apenas experimental.

Outros autores observaram a elevação do IFN- $\gamma$  mais tardiamente: KOIDE et al.<sup>(28)</sup> observaram aumento do IFN- $\gamma$  a partir do PO5 no grupo alotransplantado em relação ao grupo isotransplantado.

Observa-se que o IFN- $\gamma$  é bom indicador da rejeição, porém, não melhor que a histopatologia, porque não foram encontradas alterações desta citocina no PO3 ao comparar o subgrupo C<sub>(3)</sub> com Tx<sub>(3)</sub>. Mas a partir do PO5 observa-se diferença estatística expressiva entre os grupos analisados.

Pode-se concluir, dentro das condições de realização da presente investigação, que a detecção de interleucina-6 e IFN- $\gamma$  foram expressivas como marcadores da rejeição a partir do quinto dia de pós-operatório.

Lee ADW, Ribeiro Jr U, Alves VAF, Corbett CEP, Nonogaki S, Gama-Rodrigues J. Cytokine participation in the acute rejection of intestinal transplantation in rats. *Arq Gastroenterol* 2004;41(2):114-20.

**ABSTRACT - Background** - Intestinal transplantation is a possible treatment for patients with short bowel syndrome, aiming the reintroduction of oral diet. However, the major obstacle in this procedure is the strong rejection. Delay in rejection diagnosis may be irreversible and lethal. **Aim** - To define method for early diagnosis of rejection based on the presence of interleucina-6 (IL-6) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) from intestinal allograft. **Material and Methods** - Isogenic rats Brown-Norway (BN) and Lewis (LEW) were submitted to intestinal heterotopic allotransplantation and divided in two groups: LEW donor to LEW recipient isograft group (C) and BN donor to LEW recipient allograft group (Tx). According to the day of sacrifice, Tx group were subdivided in three subgroups with eight animals each as follow: Tx<sub>3</sub> - sacrificed at third postoperative day (POD), Tx<sub>5</sub> - sacrificed at fifth POD and Tx<sub>7</sub> - sacrificed at seventh POD. Eight animals from control group were subdivided in three moments according to the time of biopsy from the graft as follow: C<sub>3</sub> - biopsy at third POD; C<sub>5</sub> - biopsy at fifth POD and C<sub>7</sub> - biopsy at seventh POD. All animals from control group were sacrificed at seventh POD. Rejection parameters were compared between the control groups (C<sub>3</sub> vs C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub> vs C<sub>7</sub> and C<sub>5</sub> vs C<sub>7</sub>), and allograft group (Tx<sub>3</sub> vs Tx<sub>5</sub>, Tx<sub>3</sub> vs Tx<sub>7</sub> and Tx<sub>5</sub> vs Tx<sub>7</sub>). The same parameters were analyzed between the control group and allograft groups (C<sub>3</sub> vs Tx<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> vs Tx<sub>5</sub> and C<sub>7</sub> vs Tx<sub>7</sub>). **Results** - In C group no statistical significant difference regarding the immunoeexpression of the cytokines, while in Tx group, immunoeexpression of IL-6 and IFN- $\gamma$  were remarkable since the fifth postoperative day.

**HEADINGS** - Intestine, small, transplantation. Graft rejection. Cytokines. Interleucina-6. Interferon-gamma, recombinant. Rats.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Respostas imunes aos transplantes de tecidos. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. Cap.17.
- Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, Mazariegos G, Wu T, Murase N, Sindhi R, Martin D, Colangelo J, Zak M, Janson D, Ezzelarab M, Dvorchik I, Parizhskaya M, Deutsch M, Demetris A, Fung J, Starzl TE. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001;234:404-16.
- Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;80:2964-8.
- Chan SY, Debruyne LA, Goodman RE, Eichwald EJ, Bishop DK. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:1155-61.
- Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RF, Lear PA. Lymphocyte infiltration patterns in rat small-bowel transplants. *Transplant Proc* 1990;22:2460.
- 7º Congresso Brasileiro de Transplante de Órgãos; 2001; Vitória, ES. Anais. Vitória; 2001.
- De Bruin RW, Saat RE, Heineman E, Jokel J, Marquet RL. The effect of cyclosporine A in small-bowel transplantation in rats is dependent on the rat strain combination used. *Transplant Proc* 1990;22:2472-3.
- Di Martini A, Rovera GM, Grabam TO, Furukawa H, Iodo S, Funovits M, Fu S, Abu-Elmagd K. Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *JPN J Parent Enteral Nutr* 1998;22:357-62.
- Dionigi P, Alessiani M, Ferrazi A. Irreversible intestinal failure, nutrition support, and small bowel transplantation nutrition. *Nutrition* 2001;17:747-50.
- Economou JS, McBride WH, Essner R, Rhoades K, Golub S, Holmes EC, Morton DL. Tumour necrosis factor production by IL-2-activated macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 1989;67:514-9.
- Forbes RDC. Immunohistology. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LC, editors. *Transplantation biology: cellular and molecular aspects*. Philadelphia: Raven; 1996. p.113-6.
- Galvão FH, Waitzberg DL, Lee ADW, Tolosa EMC. Transplante ortotópico de intestino delgado em ratos Wistar. Técnica microcirúrgica e análise da rejeição aguda. In: Anais Congresso Brasileiro de Cirurgia; 1993; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 1993.
- Galvão FH, Waitzberg D, Logulo A, Soares S, Gonçalves EL. Histological and permeability alterations in cold-stored small bowel: a comparison of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *Transplant Proc* 1994;26:1496.
- Galvão FH, Ye Q, Doughton C, Murase N, Todo S, Zeevi A, Waitzberg D, Fung JJ, Starzl TE. Experimental animal model of graft-versus-host disease (GVHD) after small-bowel transplantation: characteristics of the model and application to developing treatment strategies. *Transplant Proc* 1997;29:700.
- Galvão FH. Novo modelo experimental de doença do enxerto versus hospedeiro após transplante de intestino delgado [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998. 63p.
- Galvão FHF. Transplante de intestino delgado. In: Waitzberg DL, editor. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p.1539-50.
- Gama-Rodrigues JJ, Engler-Pinto Jr P, Pinotti HW. Síndrome do intestino curto. In: Waitzberg DL, editor. *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.342-6.
- Grant D. Intestinal transplantation: current status. *Transplant Proc* 1989;21:2869-71.
- Grant D. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. *International Transplant Registry*. *Transplantation* 1999;67:1061-4.
- Hayashi M, Martinez OM, Krams SM, Burns W, Esquivel CO. Cytokines are involved in the rejection of small intestine allografts. *Transplantation Proc* 1997;29:1802.
- Hayashi M, Martinez OM, Krams SM, Burns W, Esquivel CO. Characterization of allograft rejection in an experimental model of small intestinal transplantation. *J Gastrointest Surg* 1998;2:325-32.
- Hell K, Gundlach M, Schmidt P, Hansmann ML, Schroeder P, Deltz E. Immunohistochemical analysis of immunocompetent cells involved in small-bowel rejection in the rat. *Transplant Proc* 1990;22:2461-2.
- Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. Inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1990;49:483-90.
- Howard L, Hassan N. Home parenteral nutrition 25 years [letter]. *Gastroenterol Clin North Am* 1998;27:481-512.
- Husband AJ, Beagley KW, McGhee DW. Mucosal cytokines. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal immunology*, San Diego, CA: Academic Press; 1999. p.559-73.
- Kato T, Ruiz P, Thompson JF, Eskind LB, Wepler D, Khan FA, Pinna AD, Nery JR, Tzakis AG. Intestinal and multivisceral transplantation. *World J Surg* 2002;26:226-37.
- Kaufman SS, Atkinson JB, Bianchi A, Goulet OJ, Grant D, Langnas AN, McDiarmid SV, Mittal N, Reyes J, Tzakis AG, American Society Of Transplantation. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. *Pediatr Transplant* 2001;5:80-7.
- Koide S, McVay LD, Frankel WL, Betling CA, Zhou ED, Shimada T, Zhang W, Rombeau JL. Increased expression of tissue cytokines in graft-versus-host disease after small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1997;64:518-24.
- Lapiere LA, Fiers W, Pober JS. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. Interactions with immune gamma interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte alpha and fibroblast beta interferons. *J Exp Med* 1988;167:794-804.
- Lear PA, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RF. Lymphocyte migration patterns in small bowel transplants. *Transplant Proc* 1989;21:2881-2.
- Lee ADW. Estudo da morbidade em transplante ortotópico de intestino delgado em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998. 124p.
- Li X, Quan D, Duff J, Zhong R, Grant D. Rat intestinal epithelial cells as accessory cells in alloimmune responses. *Transplant Proc* 1992;24:1149.
- Li X, Tucker J, Quan D, Duff J, Zhong R, Grant D. Alloantigen-presenting activity of cells from rat small intestine. *Transplant Proc* 1992;24:1150.
- McAlister V, Wall W, Ghent C, Zhong R, Duff J, Grant D. Successful small intestine transplantation. *Transplant Proc* 1992;24:1236-7.
- McDiarmid SV, Farmer DG, Kuniyoshi JS, Robert M, Khadavi A, Shaked A, Busuttill RW. The correlation of intragraft cytokine expression with rejection in rat small intestine transplantation. *Transplantation* 1994;58:690-7.
- Millard PR, Dennison A, Hughes DA, Collin J, Morris PJ. Morphology of intestinal allograft rejection and the inadequacy of mucosal biopsy in its recognition. *Br J Exp Pathol* 1986;37:687-98.
- Monchick GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971;70:693-702.
- Murase N, Demetris AJ, Kim DG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE. Rejection of multivisceral allografts in rats: a sequential analysis with comparison to isolated orthotopic small-bowel and liver grafts. *Surgery* 1990;108:880-9.
- Murase N, Demetris AJ, Matzuzaki T, Yagihashi A, Todo S, Fung J, Starzl TE. Long survival in rats after multivisceral versus isolated small-bowel allotransplantation under FK 506. *Surgery* 1991;110:87-98.

40. Murase N, Ye Q, Nalesnik MA, Demetris AJ, Abu-Elmagd K, Reyes J, Ichikawa N, Okuda T, Fung JJ, Starzl TE. Immunomodulation for intestinal transplantation by allograft irradiation, adjunct donor bone marrow infusion, or both. *Transplantation* 2000;70:1632-41.
41. Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem* 1989;264:16072-82.
42. Oberhuber G, Schmid T, Thaler W, Luze T, Klima G, Margreiter R. Increased number of intraepithelial lymphocytes in rejected small-bowel allografts: an analysis of subpopulations involved. *Transplant Proc* 1990;22:2454-5.
43. Okumura M, Mester M. The coming of age of small bowel transplantation: a historical perspective. *Transplant Proc* 1992;24:1241-2.
44. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1987;166:991-8.
45. Reis MM, Higuchi M De L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:165-72.
46. Reis MM, Higuchi M De L, Aiello VD, Benvenuti LA. Fatores de crescimento presente no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:509-18.
47. Revillon Y, Jan D, Sarnacki S, Brousse N, Ricour C. Intestinal transplantation in the child: experimental and clinical studies. *J Pediatr Surg* 1993;28:292-8.
48. Ribeiro U Jr, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreaneu RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998;83:7-18.
49. Rosa F, Fellous M. *Immunol Today* 1983;5:261.
50. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iriya K, Kim R, Bakker A, Swalsky PA, Pinotti HW, Finkelstein SD. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer* 1996;78:2288-99.
51. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Sakai P, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Gama-Rodrigues J, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev* 2000;24:13-23.
52. Scheurich P, Thoma B, Ucer U, Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987;138:1786-90.
53. Schmid T, Oberhuber G, Korozsi G, Klima G, Margreiter R. Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. Mucosal biopsies do not provide sufficient information. *Gastroenterology* 1989;96:1529-32.
54. Silva MLT, Waitzberg DL. Complicações da nutrição parenteral total. In: Waitzberg DL, editor. *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.230-3.
55. Strepkowski SM, Chen H, Daloz P, Kahan BD. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart. Kidney and small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1991;51:22-6.
56. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977;118:2020-6.
57. Su GL, Walgenbach KJ, Heeckt PH, Wang Q, Halfter W, Waitside TL, Bauer AJ. Increased expression of interferon-gamma in a rat model of chronic intestinal allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:242-8.
58. Thomson AW. FK-506 enters the clinic. *Immunol Today* 1990;35-6.
59. Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K, Reyes J, Fung JJ, Casavilla A, Nakamura K, Yagihashi A, Jain A, Murase N. Cadaveric small bowel and small bowel-liver transplantation in humans. *Transplantation* 1992;53:369-76.
60. Todo S, Tzakis A, Abu-Elmagd K, Reyes J, Furukawa H, Nour B, Fung JJ, Starzl TE. Clinical intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1993;25:2195-7.
61. Todo S, Reyes J, Furukawa H, Abu-Elmagd K, Lee RG, Tzakis A, Rao AS, Starzl TE. Outcome analysis of 71 clinical intestinal transplantations. *Ann Surg* 1995;270:270-82.
62. Tolosa EM, Goffi FS, Behmer OA, Fujimura I, Lemos PC, Freitas-Neto AG, Nakashima Y. Homologous transplantation of the small intestine in dogs. Histological evaluation of rejection. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1971;17:303-6.
63. Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation: I. An unusual pattern of cytokine expression. *Transplantation* 1996;62:851-5.
64. Toogood GJ, Rankin AM, Tam PKH, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut-associated lymphoid tissue. *Transplantation* 1997;63:1118-23.
65. Van Oers MH, Van Der Heyden AA, Aarden LA. Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 1988;71:314-9.
66. Veenendaal RA, Ringers J, Baranski A, Van Hoek B, Lamers CB. Clinical aspects of small-bowel transplantation. *Scand J Gastroenterol* 2000;232:65-8.
67. Vennarecci G, Berho M, Sommariva A, Neto AB, Misiakos EP, Inverardi L, Ruiz P, Ricordi C, Tzakis AG. Apoptosis and rejection in rat intestinal transplantation: correlation with FK506 doses and donor specific bone marrow infusions. *Transplantation* 2001;71:1718-24.
68. White FV, Reyes J, Jaffe R, Yunis EJ. Pathology of Intestinal transplantation in children. *Am J Surg Pathol* 1995;19:687-98.
69. Yano S. *Transplante de Intestino delgado em animais de pequeno porte (aspectos técnicos)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1980. 67p.
70. Zheng XX, Steele AW, Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 1995;154:5590-600.
71. Zhong R, Wang P, Chen H, Sutherland F, Duff J, Grant D. Surgical techniques for orthotopic intestinal transplantation in the rats. *Transplant Proc* 1990;22:2443-4.
72. Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen HF, Lo S, Stiller C, Duff J. Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 1991;12:268-74.

Recebido em 1/8/2003  
Aprovado em 28/11/2003.