

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE TRANSPLANTE CARDÍ-
ACO HETEROTÓPICO VASCULARIZADO E CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado

Autora: Patrícia Sesterheim

PORTO ALEGRE
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE TRANSPLANTE CARDÍ-
ACO HETEROTÓPICO VASCULARIZADO E CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS**

Autora: Patrícia Sesterheim

Dissertação de Mestrado apresentada como requisi-
to parcial para a obtenção do título de Mestre em Ci-
ências Médicas: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. David Saitovitch

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Gonçalves

PORTO ALEGRE

2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, semente imortal que carrego em mim; e a minha mãe, perfectível aroma do aconchego, a minha essência. Se algum dia, na minha vida, eu sofri, eles tanto fizeram por mim, que esqueci.

*“Comece fazendo o necessário,
depois o possível e, de repente,
você estará fazendo o impossível.”*

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e a oportunidade de estudá-la.
- Ao meu orientador e amigo, David Saitovitch, por ter me dado a honra de ser sua aluna, por ter suportado minhas limitações e me encorajado a superá-las, pelo conhecimento legado e o altruísmo em transmití-lo.
- À Dra. Valquíria Bueno, da Escola Paulista de Medicina, que de forma tão gentil, compartilhou seus conhecimentos e me auxiliou no aprendizado da técnica de transplante cardíaco em camundongos.
- Aos doutores e professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, em especial, ao Dr. Roberto Manfro e ao Dr. Luiz Felipe Gonçalves, pelo conhecimento disseminado.
- Ao meu querido amigo e professor, Dr. Elvino Barros, por quem tenho muito carinho e admiração.
- À secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Rute Helena dos Santos, pela paciência e profissionalismo.
- Aos meus queridos colegas e funcionários da Coordenação de Produção e Experimentação Animal, por ter tolerado minha ausência, pelo apoio, cari-

nho e principalmente pela ética e qualidade com que trabalham na criação e manejo dos animais de laboratório, fazendo do biotério uma peça importante no cenário da pesquisa deste Estado.

- À minha chefe e amiga, Luisa Maria Gomes de Macedo Braga, pela compreensão, pelo incansável incentivo, pelo carinho, paciência e principalmente pela amizade.

- A todos meus amigos, pelo estímulo e por compreender a minha ausência.

- Ao meu namorado, Evandro, pelos abraços, pelo respeito, carinho e incentivo.

- E, finalmente, à minha maravilhosa família, pelo eterno refúgio, cheio de amor, de zelo e de felicidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	15
INTRODUÇÃO	18
1 O DESENVOLVIMENTO DE TRANSPLANTES EXPERIMENTAIS E SUA IM- PORTÂNCIA NO SUCESSO DOS TRANSPLANTES CLÍNICOS	18
2 IMUNOSSUPRESSÃO	23
3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA	25
REFERÊNCIAS.....	28
OBJETIVO	32
ARTIGO EM PORTUGUÊS - DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS EXPERIMEN- TAIS DE TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO VASCULARIZADO E CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	37

ANIMAIS	37
TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO	38
<i>ANESTESIA</i>	38
<i>PREPARAÇÃO DO RECEPTOR</i>	39
<i>PREPARAÇÃO DO DOADOR: RETIRADA DO CORAÇÃO</i>	40
<i>IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO CARDÍACO</i>	41
<i>DETERMINAÇÃO DA REJEIÇÃO</i>	43
TRANSPLANTE CUTÂNEO	43
<i>ANESTESIA</i>	43
<i>PREPARAÇÃO DO RECEPTOR</i>	44
<i>PREPARAÇÃO DO DOADOR</i>	44
<i>IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO CUTÂNEO</i>	44
<i>DETERMINAÇÃO DA REJEIÇÃO</i>	45
RESULTADOS	45
TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO ABDOMINAL VESCLARIZADO	45
TRANSPLANTE CUTÂNEO	46
DISCUSSÃO	47
REFERÊNCIAS	54
ARTIGO EM INGLÊS - DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL TECHNIQUES OF HETEROTOPIC VESCLARIZED CARDIAC AND CUTANEOUS TRANSPLANT IN MICE	74
ABSTRACT	75
INTRODUCTION	76
MATERIALS AND METHODS	78
ANIMALS	78
HETEROTOPIC CARDIAC TRANSPLANTATION	79
<i>ANESTHESIA</i>	79
<i>PREPARATION OF THE RECEPTOR</i>	80
<i>PREPARATION OF THE DONOR: HEART REMIVING</i>	81
<i>IMPLANTATION OF THE CARDIAC GRAFT</i>	82
<i>REJECTION DETERMINATION</i>	83
CUTANEOUS TRANSPLANT	84
<i>ANESTHESIA</i>	84
<i>PREPARATION OF THE RECEPTOR</i>	84
<i>PREPARATION OF THE DONOR</i>	85
<i>IMPLANTATION OF THE CUTANEOUS GRAFT</i>	85

<i>REJECTION DETERMINATION</i>	86
RESULTS	86
HETEROTOPIC VASCULARIZED ABDOMINAL CARDIAC TRANSPLANT	86
CUTANEOUS TRANSPLANT	87
DISCUSSION	87
REFERENCES	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	- artéria pulmonar
CDCT	- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CL	- células de Langerhans
CPEA	- Coordenação de Produção e Experimentação Animal
FEPPS	- Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
G	- gauge
ip	- intra-peritoneal
mg	- miligrama
MHC	- Complexo Maior de Histocompatibilidade
min	- minutos
mL	- mililitro
TXCUT	- transplante cutâneo
TXCHA -	- transplante cardíaco heterotópico abdominal
UI	- Unidades Internacionais
VCI	- veia cava inferior

VCS - veia cava superior

LISTA DE TABELAS

Artigo em Português

Tabela 1 – Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de isotransplante cardíaco heterotópico abdominal vascularizado.....57

Tabela 2 – Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de alotransplante cardíaco heterotópico abdominal vascularizado.....58

Tabela 3 – Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de isotransplante cutâneo59

Tabela 4 – Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de alotransplante cutâneo60

Artigo em Inglês

Table 1 – List of mice strains used to develop the technique of heterotopic isotransplant cardiac vascularized abdominal97

Table 2 – List of mice strains used to develop the technique of heterotopic allotransplant cardiac vascularized abdominal.....98

Table 3 – List of mice strains used to develop the technique of cutaneous isotransplant99

Table 4 – List of mice strains used to develop the technique of cutaneous allotransplant 100

LISTA DE FIGURAS

Artigo em Português

Figura 1 - Tempo cirúrgico dispensado para a realização do transplante cardíaco em cada animal.61

Figura 2 - Gráfico de sobrevida dos enxertos cardíacos.62

Figura 3 - Tempo cirúrgico dispensado para a realização do transplante cutâneo em cada animal.63

Figura 4 - Gráfico de sobrevida dos enxertos cutâneos64

Artigo em Inglês

Picture 1 - Surgical time length to develop the cardiac transplant in each animal 101

Picture 2 - Graph of cardiac graft survival 102

Picture 3 - Surgical time length used to perform the cutaneous transplant in each animal 103

Picture 4 - Graph of cutaneous grafts survival..... 104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo em Português

- Fotografia 1** - Transplante cardíaco: preparação do receptor - *hemostasia definitiva em três veias lombares, ligadas com fio 7-0 (16X)65
- Fotografia 2** - Transplante cardíaco: preparação do receptor - posicionamento dos clampes logo abaixo das veias e artérias renais, e logo acima da emergência das ilíacas (16 X).....66
- Fotografia 3** - Transplante cardíaco: preparação do doador - ligadura da veia cava superior e visualização da aorta e artéria pulmonar (16 X)67
- Fotografia 4** - Transplante cardíaco: implantação do enxerto cardíaco - anastomose término-lateral da aorta do doador com a do receptor e anastomose término-lateral da artéria pulmonar do doador com a veia cava inferior do receptor (16 X)68
- Fotografia 5** - Transplante cutâneo: preparação do doador – retirada da pele caudal, tracionada distalmente (base-ponta)69
- Fotografia 6** - Transplante cutâneo: preparação do receptor – retirada de 1 cm² de tecido cutâneo na região tricotomizada do receptor, com uma pinça nº3 e uma tesoura fina reta para íris70

- Fotografia 7** -Tempo cirúrgico dispensado para a realização do transplante cardíaco em cada animal. Transplante cutâneo: implantação do enxerto cutâneo – fragmento de pele caudal distribuído no seu leito receptor e mantido com sutura simples transfixante nas quatro extremidades do quadrado cutâneo enxertado71
- Fotografia 8** -Transplante cutâneo: isoenxerto cutâneo em um camundongo da linhagem C57BL/6N, seis dias após o transplante72
- Fotografia 9** -Transplante cutâneo: aloenxerto cutâneo em um camundongo da linhagem BALB/c, cujo doador era uma camundongo da linhagem C3H/HeJ (seis dias após o transplante)73
- Artigo em Inglês**
- Photo 1** - Cardiac transplant: receptor’s preparation definite hemostasis in three lumbar veins, linked with 7-0 thread (16x) 105
- Photo 2** - Cardiac transplant: receptor’s preparation – clamps positioned right below the renal veins and arteries, and right above the emergency of the iliacs (16x) 106
- Photo 3** - Cardiac transplant: preparation of the donor – ligation of the superior caval vein and visualization of pulmonary aorta and artery (16x)..... 107
- Photo 4** - Cardiac transplant: implantation of the cardiac graft – terminal- lateral-anastomosis of the donor’s aorta with the receptor’s and terminal-lateral anastomosis of the donor’s pulmonary artery with the inferior vein of the receptor(16 X)..... 108
- Photo 5** - Cutaneous transplant: preparation of the donor – caudal skin takeoff, distally tractioned (base-extremity)..... 109
- Photo 6** - Cutaneous transplant: preparation of the receptor – taken off 1cm² of cutaneous tissue, in the receptor’s trichotomous, with forceps number 3 and a pair of iris- thin- straight –scissors 110

- Photo 7** - Cutaneous transplant: implantation of the cutaneous graft-caudal skin fragment distributed in the receptor's bed and kept with simple suture transfixing in the four extremities of the cutaneous graft square.....111
- Photo 8** - Cutaneous transplant: cutaneous isograft in a mouse of C57BL/6N strain, six days after the transplant.....112
- Photo 9** - Cutaneous transplant: cutaneous allograft in a mouse of of BALB/c strain, whose donor was a C3H/ HeJ mouse strain (six days after the transplant).....113

INTRODUÇÃO

1 O DESENVOLVIMENTO DE TRANSPLANTES EXPERIMENTAIS E SUA IMPORTÂNCIA NO SUCESSO DOS TRANSPLANTES CLÍNICOS

O transplante de órgãos e tecidos tem sido um desafio clínico-cirúrgico, secular, na tentativa de minimizar o sofrimento de pacientes portadores de doenças terminais. Muitas questões relevantes ainda permanecem pendentes nesta área (1), por exemplo, os mecanismos envolvidos na imunopatogênese da rejeição crônica ainda estão pouco definidos, assim como os mecanismos de aceitação a longo prazo dos enxertos (2). Modelos experimentais em animais, principalmente em coelhos, ratos e camundongos, têm representado um importante instrumento de investigação científica em transplantes (3).

Entre os primeiros relatos de transplante, está o de John Hunter (1728-1793) que descreveu o transplante do esporão do galo para a cabeça do mesmo, tendo uma boa evolução, inclusive com crescimento do esporão. Com maior relevância clínica, Biger em 1835 descreveu o transplante de córnea entre duas gazelas

com sucesso. A partir de 1925, este tipo de transplante foi bastante difundido entre seres humanos. Porém, o transplante de órgãos sólidos, que dependem de irrigação e drenagem sangüínea como o rim e o coração, ainda teria um longo caminho a percorrer, mesmo após as técnicas de anastomose vascular serem desenvolvidas (1).

Em 1912, Carrel recebeu o prêmio Nobel de medicina e fisiologia, em reconhecimento aos seus trabalhos sobre anastomose vascular e transplantes de vasos e órgãos. Preocupou-se com a idéia da substituição dos órgãos enfermos, ou danificados pelo trauma, por similares através dos transplantes. Tal possibilidade, entretanto, esbarrava nas dificuldades técnicas para a realização das anastomoses vasculares entre o órgão transplantado e o receptor. Desenvolveu a técnica da anastomose vascular fundamentada na colocação de três pontos equidistantes para aproximação das bordas a serem anastomosadas, de modo a transformar a circunferência dos vasos em um triângulo, cujos lados eram suturados com chuleio simples, facilitando as manobras e tornando-as mais rápidas e seguras. Trabalhando exclusivamente com animais, e aplicando técnicas originais, obteve brilhantes resultados no transplante de vasos sangüíneos, órgãos e até membros (4). Seu primeiro transplante cardíaco em cão, em 1902, foi realizado através de sutura dos vasos do enxerto nos vasos do pescoço do receptor (5). Neste mesmo ano, Emerich Ullmann realizou o primeiro auto-transplante experimental renal heterotópico, transplantando o rim para o pescoço de um cão, externando o ureter através da pele. Após, juntamente com Decastello, realizou um xenotransplante renal heterotópico de um cão para o pescoço de uma cabra e, por um curto período de tempo, obteve um líquido similar a urina. Estes experimentos demonstraram que, mesmo em posição heterotópica, o

rim é capaz de manter a sua funcionalidade, fato explorado, até hoje, nos transplantes renais clínicos (6).

Em 1933, Mann, Priestley, Markowitz e Yatér, verificaram as dificuldades do modelo heterotópico cervical em relação aos vasos do pescoço em variadas formas. Não descreveram o estado funcional do coração transplantado, mas foi proposto o conceito de rejeição do enxerto no modelo canino de transplante heterotópico (7).

Neste mesmo ano, Yu Yu Voronoy realizou o primeiro transplante renal em humanos. O objetivo era salvar uma jovem que estava em insuficiência renal aguda empregando um rim de doador cadáver (pré-era de morte encefálica, portanto em parada cardíaca), porém não obteve sucesso (6).

Até o final da primeira metade do século XX, as técnicas de anastomose vascular foram amplamente dominadas. Entretanto, como os alo e os xenotransplantes funcionavam por apenas um curto período de tempo, o interesse em transplantes de órgãos, por parte da comunidade científica, diminuiu (1,6,8).

Apesar do pouco conhecimento imunológico que existia nesta época, um processo inflamatório era observado nos alo e xenoenxertos e era sugerido que estivesse envolvido na disfunção destes enxertos (9).

Em 1954, em Boston, Murray documentou uma série de casos de transplante renal entre gêmeos univitelinos com sucesso, dando início à era moderna dos

transplantes de órgãos. Tal observação sugeriu que uma barreira genética desempenhava um importante papel no processo inflamatório observado na disfunção do enxerto (6,8).

Em 1964, Abbott e Lindsey, da Universidade de New Orleans, publicaram, pela primeira vez, a técnica de transplante cardíaco heterotópico abdominal (TXCHA) em ratos. Empregaram técnicas microcirúrgicas, utilizando somente duas anastomoses vasculares de forma término-terminal na veia cava e artéria aorta abdominais do receptor. O tempo total de cirurgia variava entre 60 e 90 minutos e o tempo de isquemia entre 20 e 30 minutos. Um aspecto interessante, descrito por estes autores, era a paraplegia desenvolvida após 24 horas do transplante, ocasionada pela secção da artéria aorta abdominal (10,11).

Em 1969, na mesma Universidade, Ono e Lindsey introduziram as modificações essenciais para o sucesso da técnica em pequenos animais, especialmente as anastomoses término-laterais entre a artéria pulmonar doadora com veia cava inferior receptora e aorta ascendente doadora com aorta abdominal receptora (11).

Os objetivos anátomo-funcionais sobre o coração transplantado com este modelo (em ratos Lewis) eram os de preservar a sua vitalidade orgânica, assim como permitir aos ventrículos trabalhar sem carga volumétrica. Isto faz com que os ventrículos entrem na fase de despreparação anátomo-funcional ou atrofia miocárdica. Entretanto, como o suprimento sangüíneo é preservado, a integridade do tecido é mantida por prolongados períodos em auto ou isoenxertos. Mediante este modelo,

foi possível fazer a caracterização anatômica, funcional, histológica, metabólica e genética da despreparação ou atrofia miocárdica. (12, 13, 14).

Em 1973, Robert Corry, Winn e Russel, objetivando estudar e caracterizar a resposta imunológica para aloantígenos em camundongos, desenvolveram um modelo experimental de transplante cardíaco heterotópico abdominal em camundongos, semelhante ao descrito por Ono e Lindsey (15).

Preocupado em facilitar a técnica de transplante heterotópico abdominal, Lee e colaboradores, em 1982, desenvolveram um modelo de transplante, realizando apenas a anastomose término-lateral aorto-aórtica. Nesse modelo, a circulação sanguínea ocorre pela entrada de sangue na anastomose aórtica, passando através das artérias coronárias ao sinus coronário e então ventrículo direito, de onde vai para a circulação pulmonar, entra no átrio esquerdo, ventrículo esquerdo e, finalmente, aorta do doador. A retirada do lobo do pulmão inviabiliza a sobrevivência do enxerto por interromper a circulação do lado direito do coração (16, 17).

Em 1987, Umeki realizou uma técnica cirúrgica onde a veia cava e a artéria aorta do coração foram anastomosadas na veia e artéria femoral do receptor respectivamente. Nessa técnica, há a necessidade de ruptura dos vasos femorais, e tempo maior para o início do batimento após a revascularização (60 a 120 segundos), Nesse modelo, o tempo médio de isquemia foi de 60 minutos, sendo observado que, após 90 minutos de isquemia, o coração perdia sua capacidade de contração (17).

O desenvolvimento das técnicas microcirúrgicas para transplantes de órgãos, na década de 60, favoreceu a utilização de diferentes modelos experimentais em animais de pequeno porte. Atualmente, modelos experimentais murinos cardíacos, renais e de ilhotas pancreáticas são utilizados de forma exponencial, por laboratórios de todo o mundo, como um instrumento singular para elucidação de vários aspectos controversos no transplante clínico, bem como para a compreensão dos mecanismos de aloativação, desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras e de indução de tolerância imunológica (17).

2 IMUNOSSUPRESSÃO

Atualmente o transplante de órgãos é a forma terapêutica mais eficaz para vários órgãos em disfunção crônica e terminal. O índice de sucesso do transplante renal é tal que a sobrevida dos pacientes e de seus enxertos é superior a 90 e 80% ,respectivamente, na maioria dos centros transplantadores de referência do mundo (18). Estas cifras representam um grande avanço quando comparadas com aquelas obtidas desde o início da era moderna dos transplantes de órgãos nos anos 50 até o início dos anos 80 (6). Naquela época, as sobrevidas de enxerto e pacientes eram de pelo menos 20% menores. O principal fator responsável por esta melhoria de sobrevida foi a introdução da ciclosporina no armamentário terapêutico anti-rejeição (19). Outros fatores também contribuíram para a estatística citada, tais como o aprimoramento do manejo clínico dos pacientes transplantados; o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-CD3 para uso clínico (19-21) e o avanço nas técnicas de tipagem tecidual e a conseqüente melhor compatibilidade entre receptor e enxerto (22). Ainda, hoje contamos com novas drogas imunossupressoras,

introduzidas no mercado a partir dos anos 90, como o tacrolimus (23), micofenolato mofetil (24) e a rapamicina (25).

Infelizmente, e apesar de todos estes avanços, ainda “pagamos um alto preço” pelo fato de dependermos de drogas que atuam de forma inespecífica na prevenção e no tratamento dos episódios de rejeição ao enxerto. Isto se deve ao fato de que estas também deprimem a tão importante vigilância imunológica, que é normalmente efetuada tanto pela imunidade inata, como pela imunidade adquirida (26). Desta forma, os pacientes transplantados ficam mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções (27) e de diversas formas de câncer (28). De fato, em um estudo, 58% dos receptores de transplante renal tiveram pelo menos um episódio infeccioso nos primeiros 6 meses pós-transplante (29). Em diferentes etapas após o transplante, diferentes tipos de infecção ocorrem e a dose cumulativa total de drogas imunossupressoras administrada parece ser um dos principais fatores determinantes da suscetibilidade individual ao desenvolvimento de um quadro infeccioso (30). Da mesma forma, a incidência de câncer aumenta com o passar dos anos pós-transplante de forma desproporcionalmente maior do que aquele da população em geral (31).

Apesar dos pacientes transplantados terem suas imunidades deprimidas, este estado de imunossupressão parece não ser suficiente para impedir que o lento, mas progressivo, processo de rejeição crônica leve à deterioração da função do enxerto. Este “atrito constante”, entre o sistema imunológico do receptor e os aloantígenos do enxerto, parece depender de mecanismos patogênicos diferentes da-

queles que levam à rejeição aguda e mais resistentes à ação das drogas imunossupressoras (32).

Finalmente, a necessidade de uso crônico de drogas imunossupressoras em transplante de órgãos está associada a mais um grupo de complicações frequentemente apresentadas por estes pacientes: as toxicidades destas nos diferentes órgãos ou tecidos-alvo. Estas vão desde as clássicas complicações secundárias ao uso de corticosteróides (hipertensão arterial, intolerância à glicose e diabetes, necrose óssea asséptica), à toxicidade de medula óssea causada pela azatioprina ou o micofenolato mofetil, ou a nefrotoxicidade e neurotoxicidade secundárias ao uso de inibidores da calcineurina (33-35).

Por todos estes fatores, o manejo dos pacientes submetidos ao transplante de órgãos é um desafio. Além das desvantagens acima citadas, os custos dos medicamentos imunossupressores são, atualmente, muito elevados. No primeiro ano de transplante, o custo da imunossupressão corresponde a 15% a 20% do valor total do procedimento. Já nos anos subsequentes, ele passa a representar 90% do total gasto com o paciente transplantado (36).

3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

O desenvolvimento de métodos de indução de tolerância tem sido o principal objetivo de vários laboratórios de pesquisa em transplante, desde a primeira demonstração de indução em roedores, lagomorfos e em aves, por Billingham e colaboradores em 1953 (37).

Em 1949, Burnet e Fenner começaram a elaborar a fascinante teoria da tolerância imunológica (38) e em 1960 junto a Brian e Medawar receberam o Prêmio Nobel por suas contribuições, nas quais incluíam o desenvolvimento da teoria de seleção clonal (39)

Tolerância imunológica é definida como a incapacidade específica de se desenvolver uma resposta imune normal contra um antígeno ou diversos epítopos de um certo antígeno na ausência de imunossupressão. É importante sublinhar que, em um ser dito tolerante, sua capacidade de responder a outros antígenos administrados, ao mesmo tempo que o tolerado, está preservada. Em outras palavras, a tolerância imunológica é antígeno específica. (40)

No contexto do transplante de órgãos, a consequência deste fato é a total ausência de rejeição, toxicidade de drogas, assim como a inexistência de maior suscetibilidade a infecções ou do aparecimento de câncer, visto que drogas imunossupressoras inespecíficas não se fazem necessárias.

Apesar de vários modelos experimentais em roedores já terem possibilitado a indução deste estado imunológico, estudos em animais superiores na escala filogenética têm demonstrado uma maior dificuldade, sejam estes da mesma espécie ou de espécie diferente.

É importante ressaltar que a indução de tolerância imunológica ainda não foi obtida em seres humanos de forma consistente e reprodutível. Entre as possíveis explicações para esta dificuldade, estão a maior complexidade do sistema imune

destes, a maior heterogeneidade dos antígenos de histocompatibilidade e o uso de drogas imunossupressoras inespecíficas desde o momento do transplante. Ao mesmo tempo em que estas inibem o processo de rejeição aguda, é provável que elas também interfiram com os mecanismos imunológicos envolvidos na indução de tolerância imunológica. Vários estudos têm demonstrado a presença de mecanismos ativos envolvidos na gênese e na manutenção deste estado (41-43).

Portanto, é necessário o aprofundamento do entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo de rejeição, além da avaliação de novas drogas imunossupressoras, mais seletivas e menos tóxicas, de agentes biológicos e o desenvolvimento de protocolos de indução de tolerância clinicamente aceitáveis. Para tanto, modelos experimentais de transplante de órgãos, que constituem ferramentas de investigação científica importantes, devem continuar a ser desenvolvidos e aprimorados.

REFERÊNCIAS

- 1 BAPTISTA-SILVA, J.C.C. Transplante renal. In: _____. *Cirurgia Vasculare e Transplante Renal: Guia Ilustrado*. São Paulo: Bapbaptista, 2001. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>> Acesso em: 20 out. 2003.
- 2 BILATE, A.M.; CALDAS, C. Instituto de Investigação em Imunologia. In: *Institutos do Milênio*. Disponível em: <www.iii.org.br> Acesso em: 16 fev. 2004.
- 3 SVENDSEN, P.; HAU, J. *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Florida: CRC Press, Inc., 1994.
- 4 CARREL, A. Results of Transplantation of Blood Vessels Organs and Limbs. *JAMA*1908;51:1662-7.
- 5 KÜSS, R. BOURGET, P. *An Illustred History of Organ Transplantation*. Laboratories Sandoz. Rueil-Malmaison, France, 1992. p. 1-35.
- 6 HAMILTON, D. A History. In: MORRIS, P.J. *Kidney Transplantation: Principles and Praticce*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 1-7. cap. 1.
- 7 MANN FC, PRIESTLY JT, MARKOWITZ J. et al. Transplantation of the Intact Mammalian Heart. *Arch Surg* 1933; 26:219.
- 8 BOMFIM, A.C.; COSTA, J.C.; COMPAGNARI, J.C. SROUGI, M. Fístula Urinária Após Transplante Renal. In: *Sinopse de Urologia*. São Pulo: Moreira Júnior, n.1, ano VI, 2002.
- 9 OROSZ, C.G.; WAKELY, M.E.; BUMGARDNER, G.L.; WERINGER, E.J. Experimental Models in Transplantation. In: PARNHAM, M.J. In: *Progress in Inflammation Research*. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1998.

- 10 ABBOTT C.P.; LINDSEY, E.S.; CREECH O J.R.; DEWITT C.W. A Technique for Heart Transplantation in the Rat. *Arch Surg* 1964; 89:645.
- 11 ONO K, LINDSEY E. Improved Technique of Heart Transplantation in Rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969;57(2):225-9.
- 12 GALIÑANES M.; ZHAI X. ; HEARSE D.J. The Effect of Load on Atrophy, Myosin Isoform Shifts and Contractile Function: Studies in a Novel Rat Heart Transplant Preparation. *J Mol Cell Card* 1995;27:407-17.
- 13 KLEIN I.; HONG C.; SCHREIBER S.S.. Cardiac Atrophy in the Heterotopically Transplanted Rat Heart: in Vivo Protein Synthesis. *J Moll Cell Cardiol* 1990;22:461.
- 14 DEPPE C. et al. Unloaded Heart in Vivo Replicates Fetal Gene Expression of Cardiac Hypertrophy. *Nature Medicine*, 4(11):1269-75,1998.
- 15 CORRY, R.J.; WINN, H.J.; RUSSEL, P.S. Primarily Vascularized Allografts of Hearts in Mice: The Role Of H-2D, H-2K and Non- H-2 Antigens in Rejection. *Transplantation*, v.16, n. 4, p. 343-8,1973.
- 16 LEE, S.; MACEDO, A.R.; CURTIS, G.P.; LEE, D.; ORLOFF, M.J. A Simplified Model for Heterotopic Rat Heart Transplantation. *Transplantation*,1982; 33:438-422.
- 17 BUENO, V.; PESTANA, J.O.M. *Modelos Experimentais de Transplante de Órgãos*. São Paulo: UPM, 2000. Disponível em: <http://www.mackenzie.com.br> Acesso em: 18 jul. 2000.
- 18 MORRIS, P.J. Results of Renal Transplantation. In:_____ *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1994,p. 504.
- 19 DANOVIATCH, G.M. Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. In:_____ *Handbook of Kidney Transplantation*. Brown and Company, 1996,p. 55.
- 20 AMEND Jr. et al. The First Two Post-Transplant Months. In: DANOVIATCH, G.M. *Handbook of Kidney Transplantation*. Boston:Little: Brown and Company, 1996,p. 138.
- 21 MEYER, M.M. et al. Long-Term Post-Term Management and Complications. In: DANOVIATCH, G.M. *Handbook of Kidney Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company, 1996,p. 154.
- 22 Katznelson, S. et al. Histocompatibility Testing, Crossmatching and Allocation of Cadaveric Kidney Transplants. In: DANOVIATCH, G.M. *Handbook of Kidney Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company, 1996,p. 32.

- 23 PIRSCH, J.D.; MILLER, J.; DEIERHOI, M.H. et al. A Comparison Of Tacrolimus (FK 506) And Cyclosporine For Immunosuppression After Cadaveric Renal Transplantation. *Transplantation*, v. 63, n. 7, p. 977–983, April 1997.
- 24 FULTON, B.; MARKHAM, A. Mycophenolate Mofetil: A Review Of Its Pharmacodynamic And Pharmacokinetic Properties And Clinical Efficacy In Renal Transplantation. *Drug Evaluation*, v. 51, n. 2, p. 278–298, February 1996.
- 25 MORRIS, P.J. New immunosuppressive agents In: _____ *Kidney Transplantation, Principles and Practice*. W.B. Philadelphia: Saunders, 1994, 4 ed, p. 233–243, cap. 16.
- 26 ROITT, I. et al. Adaptive and Innate Immunity. In: _____; BROSTOFF, J; MALE, D *Immunology*. London: Gower Medical Publishing, 1989, p. 1.1.
- 27 RUBIN, R.H. Infectious Disease Complications Of Renal Transplantation. *Kidney Int.* 44:221, 1993.
- 28 BARRETT, W.L. et al. Clinical Course Of Malignancies In Renal Transplant Recipients. *Cancer* 72:2186-2189, 1993.
- 29 MORRIS, P.J. et al. Low Dose Oral Prednisolone In Renal Transplantation. *Lancet* 7: 525, 1982.
- 30 KUBAK, B.M. et al. Infectious Complications of Kidney Transplantation and Their Management. In: DANOVIATCH, G.M. *Handbook of Kidney Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company, 1996, p. 187.
- 31 SHEIL, A.G.R. In: *XIVth report of the Australia and New Zeland combined dialysis and transplant registry*. The Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia, 1991, p. 100.
- 32 AZUMA, H. AND TILNEY, N.L. Chronic graft rejection. *Curr. Opin. Immunol.* 6(4):770-776, 1994.
- 33 HEAF, J. Bone Marrow Function During Quadruple Immunosuppressive Therapy After Renal Transplantation. *Clin. Nephrol.* 40:332, 1993.
- 34 GRAHAM, R.M. Cyclosporine: Mechanisms Of Action And Toxicity Cleve. *Clin. J. Med.* 61:308, 1994.
- 35 MANFRO, R.C.; GONÇALVES, L.F.; PROMPT, C.A. Transplante renal. In: BARROS, E.J.G.; MANFRO, R.C.; THOMÉ, F.S. ET AL. *Nefrologia: Rotinas, Diagnósticos e Tratamento*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2001.
- 36 MENDES, G.E.F; BURDMANN, E.A. Comparação Da Nefrotoxicidade Experimental De Duas Formulações De Microemulsão De Ciclosporina A. *J Brás Nefrol*, 2002; 24 (II); 18-25.

- 37 BILLINGHAM, R.E. et al. Actively Acquired Tolerance Of Foreign Cells. *Nature* 172:603-606, 1953.
- 38 BURNET F.M.; FENNER, F. *The Production Of Antibodies*. 2nd Edition. New York Macmillan: 1949.
- 39 _____. *The Clonal Selection Theory Of Acquired Immunity*. Cambridge: Cambridge University Press, 1959
- 40 LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR. Centro Integrado de Pesquisa Oncohematológicas na Infância. *Overview*. São Paulo:UNICAMP. Disponível em: <http://www.unicamp.br/cipoi/lic/overview.htm>. Acesso em: 22 jan. 2004.
- 41 BUSHELL, A. et al. Tolerance Induction By Antigen Pretreatment And Depleting Anti-CD4 Antibody Depends On CD4+ T Cell Regulation During The Induction Phase Of The Response. *Eur. J. immunol.* 25:2643, 1995.
- 42 QIN, S. et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259:975, 1993.
- 43 BIANCHI, A.T.J. et al. Alloantigen-Specific Suppressor T Cells Can Also Suppress The In Vivo Immune Response To Unrelated Alloantigens. *Nature* 301:614, 1983.

OBJETIVO

Desenvolver as técnicas experimentais de transplante cardíaco heterotópico abdominal e cutâneo em camundongos.

ARTIGO – DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO VASCULARIZADO E CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre. RS. Brasil.

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e aprovada pela Comissão de Ética e pela Comissão Científica do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número GPPG – 98063.

Autor para correspondência:

David Saitovitch

Hospital São Lucas

Av. Ipiranga, 6690, conj. 204 – 90610-000

Porto Alegre, RS – Brasil

Fone: (51) 3336-6046

e-mail: dsaitov@terra.com.br

DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO VASCULARIZADO E CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS

Patrícia Sesterheim¹

David Saitovitch²

Luis Felipe Gonçalves²

Resumo

Estudo experimental com o objetivo de desenvolver e avaliar a viabilidade das técnicas de transplantes experimentais cardíaco heterotópico abdominal vascularizado e cutâneo em camundongos, criando um instrumento de investigação para a eficácia de soluções de preservação, novas drogas imunossupressoras, agentes biológicos, terapia gênica e indução de tolerância imunológica. Para este estudo, as técnicas utilizadas foram descritas previamente por Corry *et al.* e Billingham *et al.* O tempo cirúrgico total para a realização dos transplantes cardíacos (n=20), foi em média $60,3 \pm 6,3$ minutos e para os transplantes cutâneos (n=20) $17,75 \pm 0,71$ minutos. A média de sobrevida dos aloenxertos cutâneos (n=34) e cardíacos (n=24) foram, respectivamente, 7 e 11 dias, enquanto que os isoenxertos sobreviveram por mais de 100 dias. Ambas as técnicas se caracterizaram pela fácil reprodutibilidade dos modelos experimentais. As diferenças entre as técnicas não se limitaram às peculiaridades metodológicas ou ao tempo de sobrevida e vascularização, mas principalmente à sua imunogenicidade, suscetibilidade à rejeição e resistência à indução de tolerância imunológica.

Palavras chave: enxerto cardíaco, enxerto cutâneo, imunologia, camundongos isogênicos, transplante.

¹ Bióloga – Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia (UFRGS).

² Professor Adjunto Doutor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

INTRODUÇÃO

Atualmente, o transplante de órgãos é a forma terapêutica mais eficaz para pacientes com disfunção orgânica terminal. O índice de sucesso do transplante renal é tal, que a sobrevida dos pacientes e de seus enxertos é superior a 90 e 80%, respectivamente, no final do primeiro ano, na maioria dos centros transplantadores de referência do mundo (1). Estas cifras representam um grande avanço quando comparadas àquelas obtidas desde o início da era moderna dos transplantes de órgãos nos anos 50 até o início dos anos 80 (2).

Contudo, esta opção terapêutica continua sendo um desafio clínico-cirúrgico, uma vez que muitas questões relevantes ainda permanecem pendentes nesta área (3). A manutenção do aloenxerto requer o uso permanente de drogas imunossupressoras, que aumentam a incidência de tumores e infecções oportunistas, mas não impedem completamente o processo de rejeição que continua sendo a principal causa de perda tardia do enxerto. Uma alternativa mais atraente seria a forma de imunossupressão específica que tornasse o receptor tolerante aos antígenos do doador sem necessidade de imunossupressão contínua (4).

Há mais de um século, experimentos em animais deram início aos transplantes de órgãos (5). Aplicando técnicas originais, Carrel, em 1902, obteve brilhantes resultados no transplante de vasos sanguíneos, órgãos e membros, quando desenvolveu a técnica da anastomose vascular, possibilitando o transplante de órgãos sólidos vascularizados como os rins e coração(5,6).

Embora as técnicas de transplante de diferentes órgãos e tecidos estejam muito bem estabelecidas, o grande desafio que persiste, continua sendo a barreira imunológica, motivando os cientistas a procurarem novos desafios no campo dos xenotransplantes, dos transgênicos, da farmacologia e do desenvolvimento de métodos de indução de tolerância imunológica (3).

Buscando entender e contornar os processos da rejeição, investigações feitas a partir dos anos 50, demonstraram a importância dos camundongos isogênicos no estudo da imunologia básica, da imunopatologia de transplantes e imunossupressão (7,8), uma vez que estas linhagens permitem controlar e prever eventos imunológicos em alotransplante experimental e estudar o estímulo antigênico durante o processo de rejeição, além das técnicas cirúrgicas do transplante, a fisiologia do mesmo e a indução de tolerância imunológica (9). Um aspecto importante foi a avaliação do papel de produtos de loci individuais do MHC no aloreconhecimento, assim como no seu potencial tolerogênico (10).

Este estudo experimental tem como objetivo desenvolver as técnicas experimentais de transplantes cardíaco heterotópico abdominal vascularizado e cutâneo em camundongos com o objetivo de utilizá-los como instrumento no estudo

dos mecanismos imunológicos envolvidos no aloreconhecimento, na avaliação de novas drogas imunossupressoras ou de agentes biológicos e na indução de tolerância.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C3H/HeJ (H2^K), C57BL/6N (H2^b) e BALB/c (H2^d) criados e mantidos, sob condições de biotério convencional, na Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA) do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul.

Todos os animais eram machos entre 8 e 10 semanas de idade. Antes e durante a fase experimental, estes animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores, receberam água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificadas com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

Todos os procedimentos adotados, durante as técnicas, envolvendo os animais, estão de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, cumprimentando a Constituição do Estado Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV de 21 de maio de 2003 (11).

TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO

Para o desenvolvimento do modelo experimental de transplante cardíaco heterotópico vascularizado em camundongos, foi empregada a técnica previamente descrita por Corry (12). Para esse fim, se fez necessário o uso de um microscópio de microcirurgia (Nikon® “Stereo microscope teaching system”, modelo SMZ-U,) além de instrumental compatível (descritos adiante) para a realização de microcirurgia, previamente auoclavados.

Foram utilizados 92 animais, entre doadores e receptores, perfazendo um total de 22 isoenxertos e 24 aloenxertos (Tabelas 1 e 2).

ANESTESIA

Depois de pesados em balança analítica (Marte®, AM220), os camundongos foram anestesiados com uma solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®, Agribrands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/ml e 10mg/mL em solução salina (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs. do Brasil Ltda.) respectivamente. Foi administrado uma dose única de 0,1mL para cada 10g de peso corporal por via intraperitoneal (ip).

A tricotomia xifopúbica, com tosador elétrico e anti-sepsia de pele com álcool etílico 70%, foi realizada na fase pré-operatória em todos os animais (doadores e receptores) após a anestesia.

Depois de anestesiados e tricotomizados, doador e receptor foram fixados pelas patas, em decúbito dorsal, com esparadrapo (Cremer[®]) em placa aquecedora a uma temperatura de 37°C.

PREPARAÇÃO DO RECEPTOR

Sob o microscópio com aumento de 16X e com uma tesoura fina reta e uma pinça de dissecação com dentes, foi feita uma abordagem abdominal através de uma laparotomia mediana xifopúbica e, com o auxílio de um afastador de Alm de 70mm (Downs[®] Downs Surgical Ltd., UK). Manteve-se uma abertura abdominal de 4 cm.

Uma gaze umedecida com solução salina 0,9% era colocada acima da abertura abdominal onde, com auxílio de hastes flexíveis com pontas de algodão (Cotonetes[®], Johnson & Johnson), as vísceras eram rebatidas para cima e para direita mediante divulsão e, cuidadosamente, envolvidas com a gaze, expondo-se, conseqüentemente, aorta e veia cava inferior (VCI). Procedia-se, delicadamente com o auxílio de pinças para íris nº05, a dissecação das veias lombares que foram ligadas com fio 7-0 (Pearsalls Sutures[®], Somerset, UK), realizando uma hemostasia definitiva em três dos vasos, o suficiente para proporcionar um bom campo cirúrgico (Fotografia 1).

Aorta e VCI foram mantidas em contigüidade, pois além de não interferir na confecção das anastomoses, a dissecação do plano intervascular aumentaria,

desnecessariamente, o tempo cirúrgico, além de poder ocorrer a fragilização da parede da VCI e sangramento.

Clampes vasculares de 5 mm (Scoville Lewis[®], Downs Surgical Ltd., UK) foram posicionados logo abaixo das veias e artérias renais, e logo acima da emergência das ilíacas (Fotografia 2). Finalmente, aortotomia e venotomia foram realizadas, adjacentes uma da outra, respeitando-se a relação espacial entre a saída da artéria pulmonar (AP) e da aorta, usando-se uma agulha fina 24G e estendidas com uma micro-tesoura reta de 85mm. Neste momento, com os vasos apenas reparados, cobriu-se a incisão com gaze umedecida e o receptor foi colocado à espera enquanto o coração do doador era isolado.

PREPARAÇÃO DO DOADOR: RETIRADA DO CORAÇÃO

Com o animal em decúbito dorsal, já anestesiado, a abordagem abdominal foi idêntica à do receptor.

Na VCI foi infundida uma solução de heparina sódica (Liquemine[®], Roche Brasil), 10UI/10g de peso corporal, diluída em solução salina. Após a retirada da agulha (24G), a exangüinação ocorre pelo orifício deixado pela mesma.

Para expor amplamente a cavidade torácica, com uma tesoura fez-se uma abertura e ressecção da parede anterior mediante secção paraesternal bilateral, seguida de luxação manual das articulações costovertebrais e incisão diafragmática bilateral.

Individualmente, VCI distal, veia cava superior proximal (VCS) e veia ázigos foram ligadas com fio de sutura 7-0 e seccionadas com micro-tesoura reta. A aorta foi seccionada anteriormente à artéria braquiocefálica, já a artéria pulmonar foi seccionada anteriormente à bifurcação (Fotografia 3).

Para completar a liberação do coração, atou-se, em bloco, com fio 7-0(Prolene, Ethicon®), as veias pulmonares, tendo-se o cuidado para que ficassem livres aorta e AP e deixando um fio de reparo para auxiliar neste manejo. O coração foi gentilmente destacado do tórax do doador e colocado em um Becker (50mL) com solução salina a 0,9% a 4°C. Para manter a temperatura, enquanto o receptor é re-manejado, o Becker foi mantido em gelo seco.

IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO CARDÍACO

O coração do doador foi retirado da solução salina e acomodado no abdômen do receptor de maneira que a ligadura em blocos fosse mantida, durante a cirurgia, cranialmente ao receptor. Durante a implantação do enxerto cardíaco, o mesmo foi permanentemente gotejado com solução salina (4°C) para sua proteção.

Iniciou-se pela anastomose término-lateral da aorta do doador com a do receptor. Um ponto foi feito na extremidade proximal da aortotomia e outro na extremidade distal, a partir do qual foi iniciada a sutura simples contínua de um lado da elipse formada, terminando na extremidade proximal. Repetiu-se o mesmo procedimento no outro lado da elipse. A mesma técnica foi empregada à anastomose

da AP com a VCI . Ambas anastomoses vasculares foram feitas usando-se fio de sutura 10-0 com agulha 0,07mm (Ethilon[®], Surgicon Ltd., UK).

Concluídas as anastomoses (Fotografia 4), as mesmas foram circundadas com esponja hemostática (Gelfoam[®], Pharmacia & Upjohn Co.,EUA) e os clampes foram retirados, primeiramente o proximal e depois o distal. A perfusão é realizada com sangue proveniente da aorta abdominal do receptor que entra de forma retrógrada, pela aorta do receptor. Devido à competência anti-refluxo da válvula aórtica, este entra nas artérias coronárias do enxerto, perfunde o miocárdio, e retorna ao átrio e ventrículos direitos através das veias coronárias, e então para artéria pulmonar, ainda no coração do doador, passando para veia cava abdominal do receptor. Trata-se, portanto, de um modelo de transplante não funcional, visto que as cavidades cardíacas não recebem sangue.

Terminada as anastomoses, as vísceras eram recolocadas na cavidade abdominal, com auxílio de hastes de algodão, em volta do enxerto. Suturou-se com fio 7-0 (Prolene, Ethicon[®]) os planos muscular e cutâneo, retirou-se os esparadrapos que estavam presos às patas e manteve-se o animal sobre a placa aquecedora por mais 2 horas. Finalmente, o receptor era colocado em gaiola individual mantendo-se o manejo rotineiro adotado pelo biotério da CPEA.

DETERMINAÇÃO DA REJEIÇÃO

A função do enxerto cardíaco era monitorada, diariamente, até 100 dias do transplante, através de palpação direta do abdômen, por dois ou mais investigadores.

TRANSPLANTE CUTÂNEO

Para o desenvolvimento do modelo experimental de transplante cutâneo, foi empregado o procedimento descrito por Billigham e Madawar (13, 14). Para este fim, foram utilizados 21 doadores e 64 receptores entre as diferentes linhagens, realizando-se 30 isoenxertos e 34 aloenxertos (Tabelas 3 e 4).

ANESTESIA

Os camundongos receptores foram, depois de pesados em balança analítica, anestesiados com uma solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun[®], Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10%(Dopalen[®], Agribbrands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/mL e 10mg/mL de solução salina (0,9%) respectivamente. Foi administrado uma dose única de 0,05mL para cada 10g de peso corporal por via intraperitoneal (ip), suficiente para abolir a dor e realizar o procedimento em tempo hábil de 15 minutos.

PREPARAÇÃO DO RECEPTOR

Após anestesia, era realizada a tricotomia dorso-lateral (4 cm²) com máquina para tosa (Oster®, USA), seguida de anti-sepsia com álcool etílico 70% e o animal era colocado em decúbito dorsal.

PREPARAÇÃO DO DOADOR

No doador, foi realizada a eutanásia através de deslocamento cervical preconizada pela Lei 714, de 20 de junho de 2002 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras providências, do *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (15, 16).

A pele da base da cauda do animal era seccionada, transversalmente, com lâmina de bisturi nº24 (Solidor®) e após, longitudinalmente. Com o auxílio de uma pinça de dissecação, esta era tracionada distalmente (base-ponta), retirada do animal (Fotografia 5) e submersa em solução salina 0,9% a 4°C.

IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO CUTÂNEO

Na região tricotomizada do receptor, com uma pinça nº3 e uma tesoura fina reta para íris, foi retirado 1 cm² de tecido cutâneo (Fotografia 6). Com a lâmina de bisturi, foi seccionado um 1 cm² da pele total da cauda do doador. Com uma pinça, o fragmento de pele caudal foi distribuído no seu leito receptor e mantido com

sutura simples transfixante nas quatro extremidades do quadrado cutâneo enxertado (Fotografia 7).

Recuperado da anestesia, o animal foi colocado em gaiola individual mantendo o manejo rotineiro adotado pelo biotério da CPEA.

DETERMINAÇÃO DA REJEIÇÃO

Diariamente os animais eram observados, até 100 dias do transplante, e a rejeição era confirmada diante da observação da combinação de algumas características: cianose, eritema, erosão e, finalmente, perda total do enxerto cutâneo.

RESULTADOS

TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO ABDOMINAL VASCULARIZADO

Analisando uma amostra de animais (n=20) escolhidos aleatoriamente, observamos que o tempo cirúrgico total para a realização dos transplantes foi em média $60,3 \pm 6,3$ minutos, sendo dispensado para preparação do receptor $22,9 \pm 3,1$ minutos, para a liberação do coração do doador $11,1 \pm 1,5$ minutos e para confecção das anastomoses $26,3 \pm 3,6$ minutos (Figura 1).

Do total de 22 isotransplantes cardíacos realizados, através da palpação direta, observou-se que 4 horas após o transplante, um dos animais (4%) não apresentava o batimento do enxerto, morrendo 5 horas após a constatação. Em ou-

tro, houve paraplegia, observada após o término do efeito anestésico (animal nº2) (Figura 2). Embora o batimento do enxerto fosse percebido, em virtude desta paralisia e o sofrimento apresentado, a eutanásia, nestes casos, é indicada e realizada 48 horas após o transplante. Os demais camundongos (20 animais) e seus respectivos enxertos (91%) sobreviveram por mais de 100 dias após a cirurgia (Figura2).

Entretanto, dos 24 alotransplantes cardíacos realizados, constatou-se ausência de batimento do enxerto cardíaco em oito animais no 10º dia após o transplante; em doze animais no 11º dia e quatro animais no 12º dia (Figura 2).

TRANSPLANTE CUTÂNEO

Para a preparação do receptor do enxerto cutâneo, a média de tempo dispensado, observada em uma amostra aleatória (n=20) foi de $7,0\pm 0,9$ minutos; entre a eutanásia e a retirada da pele da cauda do doador o tempo utilizado foi de $5,00\pm 0,8$ minutos e a implantação do enxerto cutâneo, $5,75\pm 0,71$ minutos perfazendo uma média de tempo total de cirurgia de $17,75\pm 0,71$ minutos (Figura 3).

Na figura 4 observamos que, nos 30 isotransplantes cutâneos realizados, não houve rejeição (Fotografia 8). Entretanto, dos 34 alotransplantes, nove enxertos foram rejeitados no 6º dia (27%), doze no 7º dia (35%) e treze enxertos cutâneos rejeitados no 8º dia (38%) (Fotografia 9).

DISCUSSÃO

O camundongo é o animal experimental de escolha, em várias áreas, por ser de fácil criação e manipulação, ter uma reprodução rápida, comportamento dócil, resistência a infecções e traumas cirúrgicos, larga diversidade genética, grande similaridade biológica e disposição anatômica das estruturas internas, quando comparadas à espécie humana. Além disso, estima-se que a homologia do DNA codificador, entre estas duas espécies, esteja compreendida entre 70 a 90% (7,9,17).

As linhagens isogênicas, pelo cruzamento entre irmãos, durante, pelo menos, 20 gerações, originando populações de camundongos geneticamente idênticos (8), constituem uma das maiores vantagens no uso deste modelo para o estudo dos mecanismos imunológicos (8,9).

Assim sendo, os animais de laboratório, em especial os camundongos, são utilizados de forma exponencial no desenvolvimento de modelos experimentais de transplante, principalmente cardíaco, renal e de ilhotas pancreáticas.

Os pesquisadores Robert Corry, Henry Winn e Paul Russel, em 1973, reconhecendo a importância do uso de linhagens isogênicas para a compreensão de eventos imunológicos, desenvolveram um modelo experimental cardíaco murino semelhante ao protocolado experimentalmente para aloenxertos cardíacos em ratos, por Ono e Lindsey, em 1969 (12,18). Assim como o transplante cutâneo, atualmente, este é o modelo experimental mais utilizado nas pesquisas biomédicas (19,20,21).

A técnica experimental de transplante cardíaco heterotópico vascularizado em camundongos, descrito por Corry *et al.* (12) e desenvolvido neste estudo, embora possa ser realizado por apenas um único cirurgião, requer um treinamento microcirúrgico prévio, no mínimo quatro meses, para aquisição de destreza manual, uma vez que, se tratando de um animal de pequeno porte ($\pm 35g$), se faz necessário, além de microscópio, o uso de um instrumental específico para microcirurgia. Falhas técnicas são responsáveis pelos óbitos dos animais nas primeiras 72 horas após o transplante (9). Contudo, assim como relatado por Corry, o sucesso da técnica aproxima-se de 90% (Figura 2).

Outro fator limitante no transplante em camundongos, é a anestesia. Pequenos animais como ratos, camundongos ou hamsters possuem um metabolismo relativamente elevado, necessitando assim de uma dose mais alta de anestésico, quando comparados com espécies maiores. Ainda, há diferença no uso de anestésico, também, entre linhagens diferentes da mesma espécie. Sendo assim, há dois fatores que dificultam a anestesia em camundongos: o baixo peso corporal, aumentando o risco de overdose, ocasionando hipotermia e, muitas vezes, a morte; e as diferentes linhagens que metabolizam de forma diferenciada os agentes anestésicos. Deste modo, a padronização e administração das doses entre linhagens distintas de camundongos isogênicos, para uma média de tempo cirúrgico de uma hora ($61,14 \pm 7,31$ min.), deve ser bastante flexível (22).

Os vasos (1 - 3 mm de diâmetro) e demais estruturas de camundongos possuem tamanho muito reduzido e são extremamente delicados (23). Mesmo hastes de algodão, se atritadas contra as paredes da VCI e aorta abdominal, podem

fragilizá-las e causar sangramento. É necessário que o cuidado redobre durante a dissecação das veias lombares para hemostasia definitiva. Este procedimento é realizado com pinça reta para íris, e sendo estes vasos extremamente sensíveis, qualquer toque efetuado com a pinça pode ser suficiente para causar uma ruptura e hemorragia. O mesmo cuidado deve ser tomado durante as ligaduras das veias e artérias para liberação do coração do doador. Pequeno contato das pinças, com os átrios ou ventrículos pode causar perfurações imperceptíveis até o momento que o enxerto, uma vez anastomosado, é perfundido, levando ao insucesso da técnica e, conseqüentemente, à morte do animal.

A incidência de paraplegia (n=1) associou-se com um tempo de isquemia medular próximo dos 60 minutos (Figura 1). Esta complicação é, geralmente, contornada com o aumento da destreza com a técnica e a diminuição do tempo cirúrgico.

Este modelo de transplante experimental possui a vantagem de permitir a avaliação imediata da função do enxerto pela visualização imediata do batimento cardíaco, evidenciando assim o sucesso da técnica (9). Entretanto, ocasionalmente, há a necessidade de massagear o enxerto cardíaco até que volte ao seu ritmo normal (12). O mesmo é perfundido com sangue oxigenado, proveniente da aorta abdominal do receptor, que entra na artéria coronária do enxerto e retorna ao átrio e ventrículo direitos e então para artéria pulmonar drenando para veia cava inferior do receptor.

Embora esta perfusão seja mantida durante a sobrevivência do enxerto, ocorre ausência de enchimento ventricular esquerdo, o que leva à hipotrofia do músculo cardíaco isolado (19).

A monitoração da contração cardíaca do enxerto, através de palpação direta do abdômen, realizada diariamente, algumas vezes pode ser confundida com a transmissão da pulsação da aorta do doador (24). Batimentos muito fortes da artéria podem significar obstrução, da mesma forma que o ingurgitamento da veia (25).

Assim como o modelo experimental cardíaco murino, o transplante cutâneo é utilizado amplamente em pesquisas que objetivam o aprofundamento da compreensão da imunologia dos transplantes, principalmente os mecanismos envolvidos na rejeição e sua prevenção e tratamento (9,14).

A técnica de transplante cutâneo, desenvolvida neste estudo, foi estabelecida e padronizada por Billingham e Medawar, em 1951, passo importante para o estudo das bases imunológicas da rejeição ao aloenxerto (13,26).

Os enxertos cutâneos são uma excelente forma de identificar a histocompatibilidade entre doador e receptor, técnica largamente utilizada em biotérios para avaliar a isogenicidade em colônias de animais *inbred* (8, 23).

Esta técnica possui a vantagem de ser simples e rápida, podendo ser realizada em série, uma vez que o tempo entre a retirada do enxerto e seu transplante não ultrapassa 20 minutos (Figura 3). Outra vantagem é a realização de até 5

transplantes com a pele da cauda de um único doador. Além disso, o curto período de anestesia exige uma dose menor de anestésicos, não havendo riscos maiores para o animal (14,22).

A sobrevida, ou a rejeição do enxerto, é facilmente monitorada (avaliação visual), baseada no aspecto da pele, exibindo características bem definidas de rejeição aguda e crônica (26). A rejeição aguda ocorre, normalmente na primeira semana após o transplante (Figura 4) e o enxerto apresenta os vasos dilatados e cianose, seguida de erosão cutânea. Já a rejeição crônica, pode levar semanas ou até mesmo meses, dependendo da histocompatibilidade entre doador e receptor (13, 26).

Contudo, a técnica possui limitações. Está bem estabelecido que enxertos avascularizados estão sujeitos à degeneração isquêmica que pode levar à inflamação e necrose, mesmo quando singeneicos (27). Entretanto, está sendo demonstrado que aloenxertos cardíacos não-vascularizados são rejeitados mais lentamente, e às vezes até mesmo não são rejeitados, do que enxertos cutâneos entre a mesma combinação de linhagens (21). Sendo assim, a diferença no modo de vascularização, não parece ser a única diferença na sobrevida dos enxertos cutâneo (7ºdia) e cardíaco (11ºdia).

As diferenças entre as técnicas não se limitam às complexidades metodológicas ou vascularização, mas principalmente aos mecanismos efetores, suscetibilidade à rejeição ou resistência à indução de tolerância imunológica (29-31).

A existência de uma hierarquia na suscetibilidade à rejeição de diferentes aloenxertos (pele, ilhotas pancreáticas e coração), está bem definida, contudo os mecanismos responsáveis são desconhecidos. Embora o enxerto cardíaco estimule a ativação de um número muito maior de células T alorreativas do que o enxerto cutâneo, a pele apresenta maior suscetibilidade à rejeição e maior resistência à indução de tolerância (21). Por outro lado, Sun *et al.* demonstraram que quanto maior a massa aloenxertada, maior pode ser a sua sobrevida. Um único coração ou rim transplantados, entre diferentes linhagens de ratos, sofre rejeição aguda, em curto espaço de tempo; entretanto o transplante simultâneo de dois corações ou dois rins em um único receptor resulta em uma maior sobrevida destes aloenxertos (32).

Estudos sugerem que o microambiente e a carga antigênica do enxerto podem ter um importante papel na determinação da suscetibilidade à rejeição de um aloenxerto e resistência a indução de tolerância imunológica (21,27,32). Além disso, outra explicação para a maior suscetibilidade da pele à rejeição (e menor à indução de tolerância), é a presença de antígenos tecido-específicos, para os quais a tolerância central (tímica) não foi desenvolvida pelo receptor (21).

É exatamente esta maior dificuldade na indução de tolerância imunológica do enxerto cutâneo, aliado à facilidade de sua realização, que o torna um modelo experimental interessante e com maior relevância clínica, quando comparado a modelos vascularizados.

Infelizmente, ainda não existem meios seguros e reproduzíveis de se induzir tolerância imunológica, no contexto dos transplantes, em seres humanos.

Embora apresentem limitações, os modelos experimentais murinos, desenvolvidos neste estudo, constituem ferramentas importantes para o avanço do conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no aloreconhecimento e produção de tolerância.

REFERÊNCIAS

- 1 MORRIS, P.J. Results of Renal Transplantation. In:_____ *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1994,p. 504.
- 2 DANOVIATCH, G.M. Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. In:_____ *Handbook of Kidney Transplantation*. Brown and Company, 1996,p. 55.
- 3 BAPTISTA-SILVA, J.C.C. Transplante renal. In: _____. *Cirurgia Vasculiar e Transplante Renal: Guia Ilustrado*. São Paulo: Bapbaptista, 2001. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>> Acesso em: 20 out. 2003.
- 4 NOVELLO, R. *Avaliação da Influência da Injeção Intratímica de Antígenos do Doador e Imunossupressão Inespecífica em Aloenxerto de Pele*. São Paulo: SBN, 2000. p. 83.
- 5 KÜSS, R. BOURGET, P. *An Illustred History of Organ Transplantation*. Laboratories Sandoz. Rueil-Malmaison, France, 1992. p. 1-35.
- 6 CARREL, A. Results of Transplantation of Blood Vessels Organs and Limbs. *JAMA*1908;51:1662-7.
- 7 SOARES, M.B.P; CARVALHO, L.C.P.; SANTOS, R.R. Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados: uma Estratégia para a Preservação. Rio de Janeiro: *Biotec Ciênc e Desenv* , mai./jun. 2001.n. 20.
- 8 ANDRADE, A. PINTO, S.C.; DE OLIVEIRA, R.S. ET AL. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 388.

- 9 BUENO, V.; PESTANA, J.O.M. *Modelos Experimentais de Transplante de Órgãos*. São Paulo: UPM, 2000. Disponível em: <<http://www.mackenzie.com.br>>. Acesso em: 18 jul. 2000.
- 10 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.L.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 4 ed. p.544.
- 11 RIO GRANDE DO SUL. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. *Constituição do Estado*, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.
- 12 CORRY, R.J.; WINN, H.J.; RUSSEL, P.S. Primarily Vascularized Allografts of Hearts in Mice: The Role Of H-2D, H-2K and Non- H-2 Antigens in Rejection. *Transplantation*, v.16, n. 4, p. 343-8,1973.
- 13 BILLIGHAM, R.E.; MADAWAR, P.B. The Technique of Free skin grafting in mammals. *J Exp Biol*, 1951. 28:385-402.
- 14 GREEN, M.K.; MANDEL, T.E.; Skin Grafting in mice: Indicators of Cell-Mediated and Humoral Immunity. In: LOVELAND, B.E.; HENNING, M.M. *Experimental Transplantation Models in Small Animals*. Hardcover: Dunitz Martin Ltda, 1995. p. 195-14. cap IX.
- 15 BRASIL. Lei 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, art 16, 20 jun. 2002.
- 16 COBEA. *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: Legislação e Ética*. São Paulo. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 20 mar. 2002.
- 17 GODARD, A.L.B O Espelho Milagroso: O Poder Do Camundongo. Agência Brasil: Ciência & Tecnologia, 11 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.radiobras.gov.br/ct/>> Acesso em: 20 dez. 2003.
- 18 ONO K, LINDSEY E. Improved Technique of Heart Transplantation in Rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;57(2):225-9.
- 19 ABBOTT, C.P.; DeWITT, C.W.; CREECH. O.Jr. The Transplanted Rat Heart: Histologic And Electrocardiographic Changes. *Transplantation*, 3: 432-445, 1965.
- 20 ROSZ, C.G.; WAKELY, M.E.; BUMGARDNER, G.L.; WERINGER, E.J. Experimental Models in Transplantation. In: PARNHAM, M.J. In: *Progress in Inflammation Research*. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1998.
- 21 JONES, N.D. Differential Susceptibility of Heart, Skin and Islet Allografts to T Cell-Mediated Rejection. *The J Immun*, 2001, 166: 2824-2830.

- 22 SVENDSEN, P. Laboratory Anesthesia. In: _____ ;HAU, J. *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Florida: CRC Press, Inc., 1994, cap. 19.p. 435.
- 23 STEINBRÜCHEL, D.A. Laboratory Anesthesia. In: SVENDSEN, P.; HAU, J *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Florida: CRC Press, Inc., 1994, cap. 22. p.435.
- 24 SAITOVITCH, D. *Transplantation tolerance: an Experimental Model Exploring Mechanisms of its Induction and Maintenance After Pre-Treatment with Donor Antigen and Anti- CD4 Antibodies*. Oxford: University of Oxfor, 1995.p. 207.
- 25 PESSOA, B.B.G.P.O Retalho Hipogástrico Cutâneo no Cão: Modelo Para O Aprendizado Experimental de Microcirurgia. São Paulo: *Acta Cir Bras*,2002. vol. 17 n.3.
- 26 KLEIN, J. *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex: Principles of Immunogenetics applied to a Single System*. New York: Springer-Verlag, 1975 p.620.
- 27 MEDAWAR, P.B. The Behaviour and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits. *J Anat*, 1944, 78:176.
- 28 YOUSSEF, A.R.; OTLEY, C.; MATHIESON, P.W.; SMITH, R.M. Effector Mechanisms in Murine Allograft Rejection: Comparison of Skin and Heart Grafts in Fully Allogeneic and Minor Histocompatibility Atigen-Mismatched Strain Combinations. *Transplant Int* 2002, 15(6): 302-9.
- 29 PHILLIPS, N.E. et al. Blockade of CD40- Mediated Signaling Is Sufficient for Inducing Islet but not Skin Transplantation Tolerance. *The J Immun*, 2003, 170: 3015-3023.
- 30 GODDARD, S. et al. Interleukin-10 Secretion Differentiates Dentric Cells from Human Liver and Skin. *Am J Pathol*, 2004, 164 (2):511.
- 31 HASEGAWA, S. et al. Pattern of Graft- and Host-Specific MHC Class II Expresión in Long-Term Murine Cardiac Allografts. *Am J Pathol*, 1998, 153: 69-79.
- 32 SUN, J., G. W.; MCCAUGHAN, N. D.; GALLAGHER, A. G. R.; SHEIL, G. A. BISHOP. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation*, 1995, 60:233.

Tabela 1

Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de isotransplante cardíaco heterotópico abdominal vascularizado

Doador	Receptor	Haplótipo	Nº de isotransplan- tes
C3H/HeJ	C3H/HeJ	H2 ^K	6
BALB/c	BALB/c	H2 ^d	8
C57BL/6N	C57BL/6N	H2 ^b	8

Número de animais utilizados: 44
n=22

Tabela 2

Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de alotransplante cardíaco heterotópico abdominal vascularizado.

Doador	Receptor	Haplótipo	Nº de transplantes
C3H/HeJ	BALB/c	H2 ^K - H2 ^d	8
BALB/c	C57BL/6N	H2 ^d - H2 ^b	8
C57BL/6N	BALB/c	H2 ^b - H2 ^d	8

Número de animais utilizados: 48
n=24

Tabela 3

Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de isotransplante cutâneo.

Doador	Receptor	Haplótipo	Nº de transplantes
C3H/HeJ	C3H/HeJ	H2 ^K	10
BALB/c	BALB/c	H2 ^d	10
C57BL/6N	C57BL/6N	H2 ^b	10

Número de animais utilizados: 39
n=30

Tabela 4

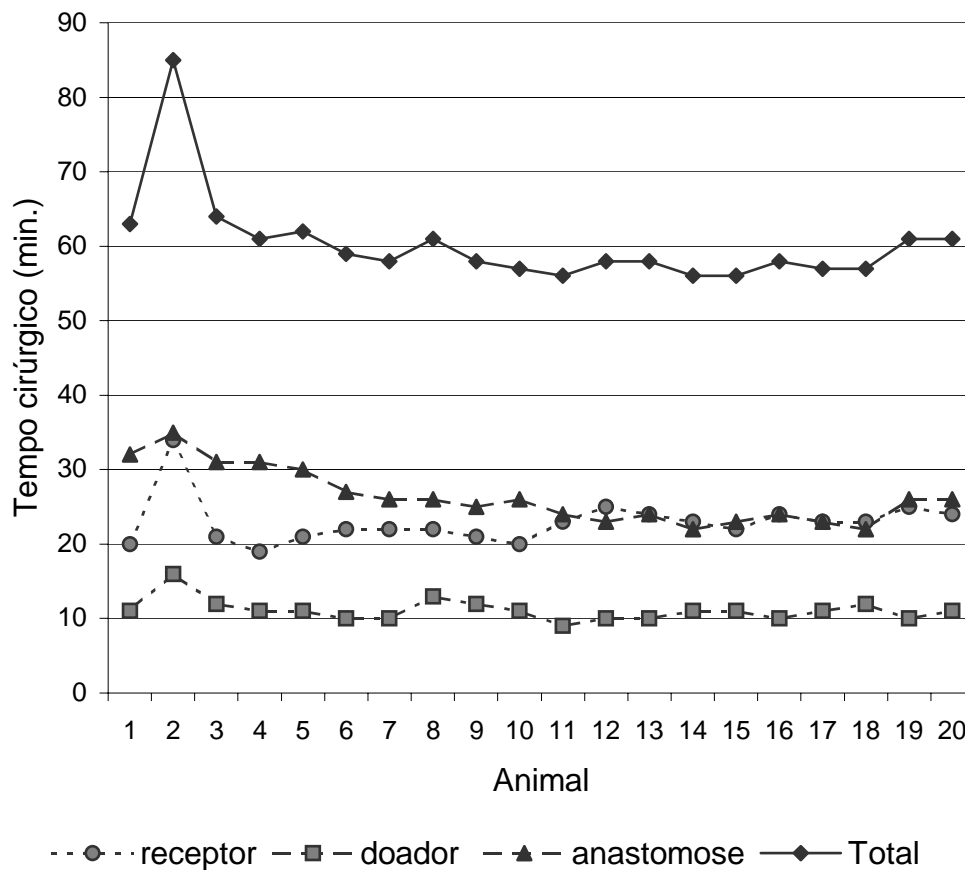
Lista das linhagens de camundongos utilizadas para o desenvolvimento da técnica de alotransplante cutâneo.

Doador	Receptor	Haplótipo	Nº de transplantes
C3H/HeJ	BALB/c	H2 ^K - H2 ^d	10
BALB/c	C57BL/6N	H2 ^d - H2 ^b	12
C57BL/6N	BALB/c	H2 ^b - H2 ^d	12

Número de animais utilizados: 46
n=34

Figura 1

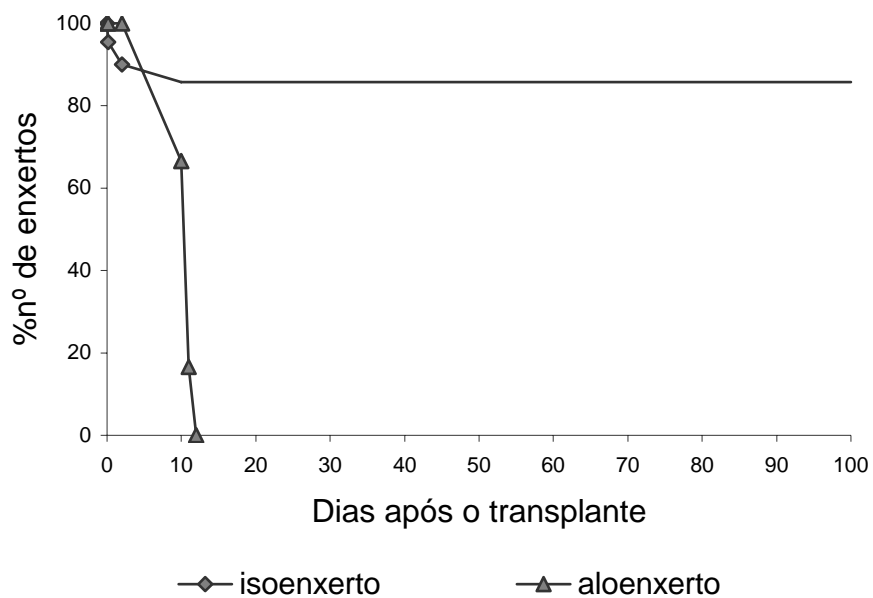
Tempo cirúrgico dispensado para a realização do transplante cardíaco em cada animal.



Amostra de 20 animais escolhidos de forma aleatória para demonstrar a evolução do tempo cirúrgico de acordo com a experiência do experimentador.

Figura 2

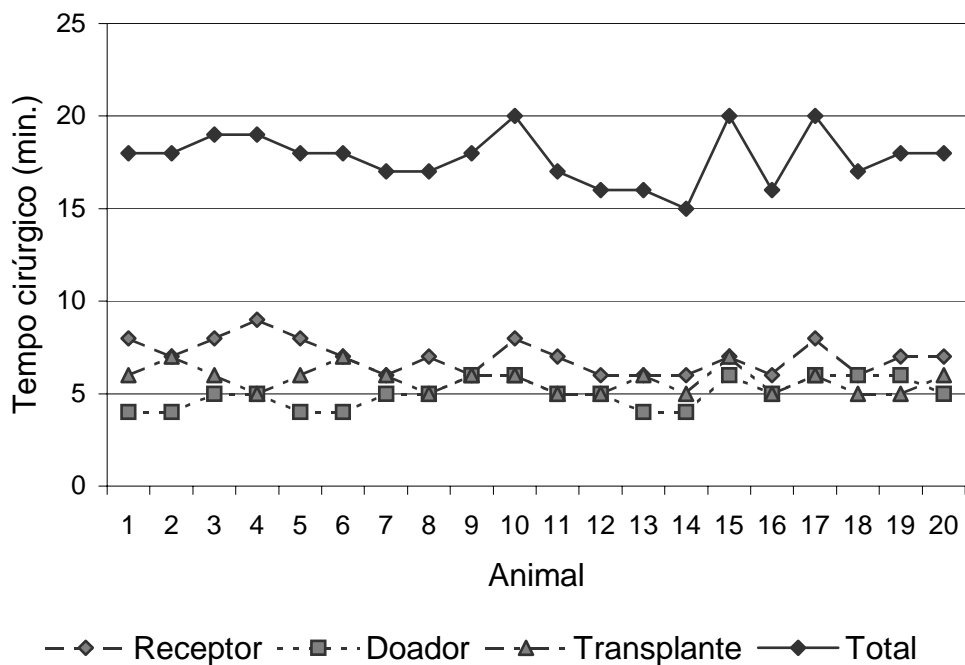
Gráfico de sobrevivência dos enxertos cardíacos.



n=22 isotransplantes
n=24 alotransplantes

Figura 3

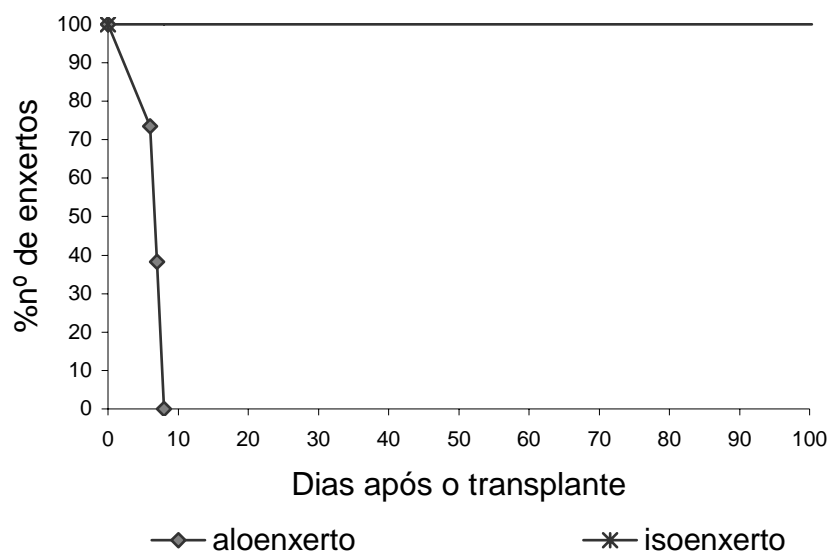
Tempo cirúrgico dispensado para a realização do transplante cutâneo em cada animal.



Amostra de 20 animais escolhidos de forma aleatória para demonstrar a evolução do tempo cirúrgico de acordo com a experiência do experimentador.

Figura 4

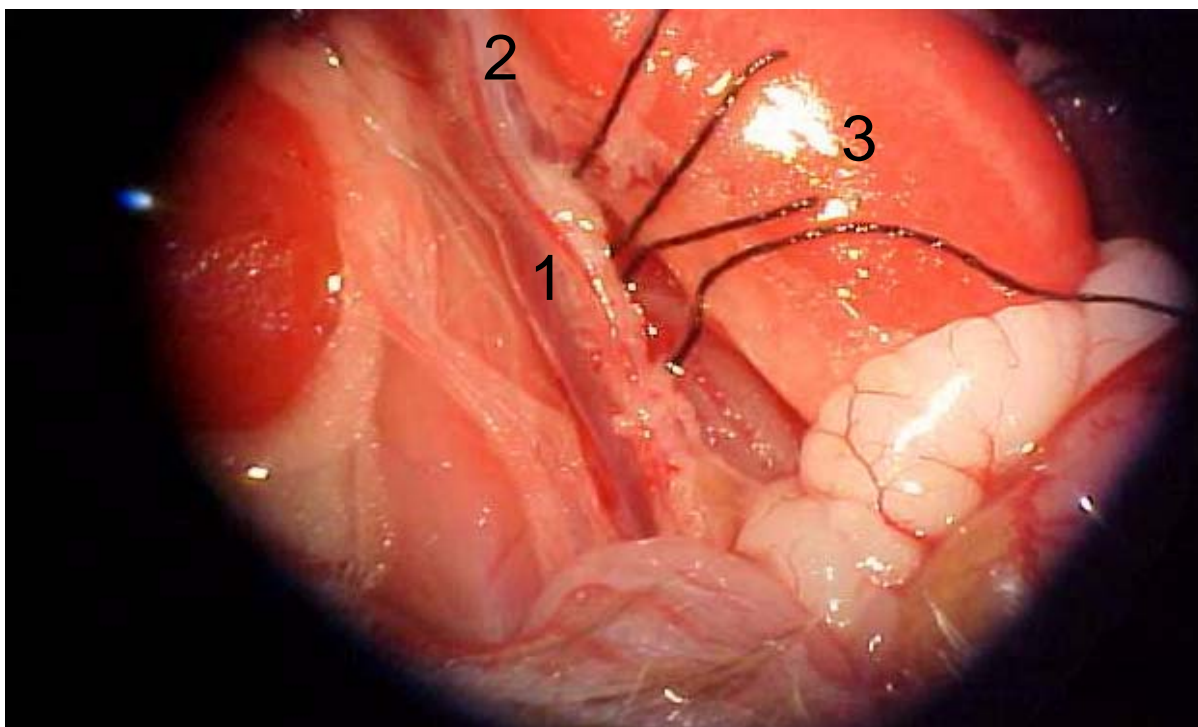
Gráfico de sobrevivência dos enxertos cutâneos.



n=30 isotransplantes
n=34 alotransplantes

Fotografia 1

Transplante cardíaco: preparação do receptor - *hemostasia definitiva em três veias lombares, ligadas com fio 7-0 (16X)

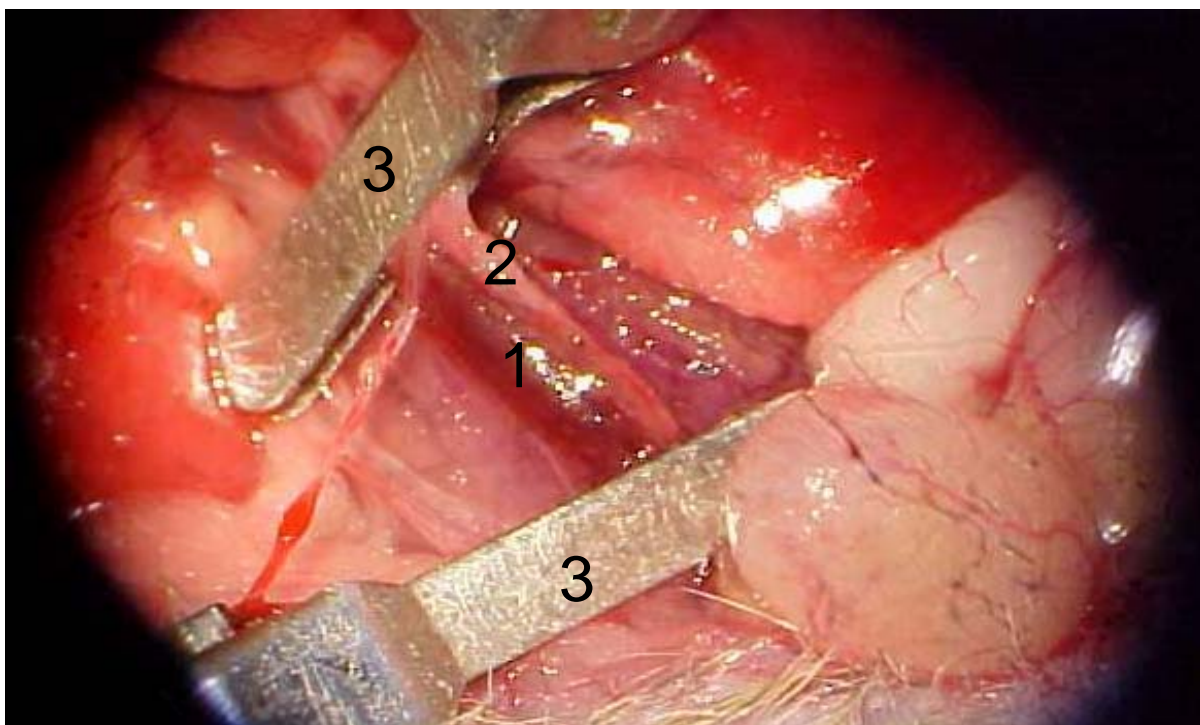


*Etapa crítica da preparação do receptor – ligadura dos vasos perforantes; momento em que a aorta e veia cava inferior estão preparadas.

- 1 – Veia cava inferior;
- 2 – Aorta abdominal;
- 3 – Rim esquerdo.

Fotografia 2

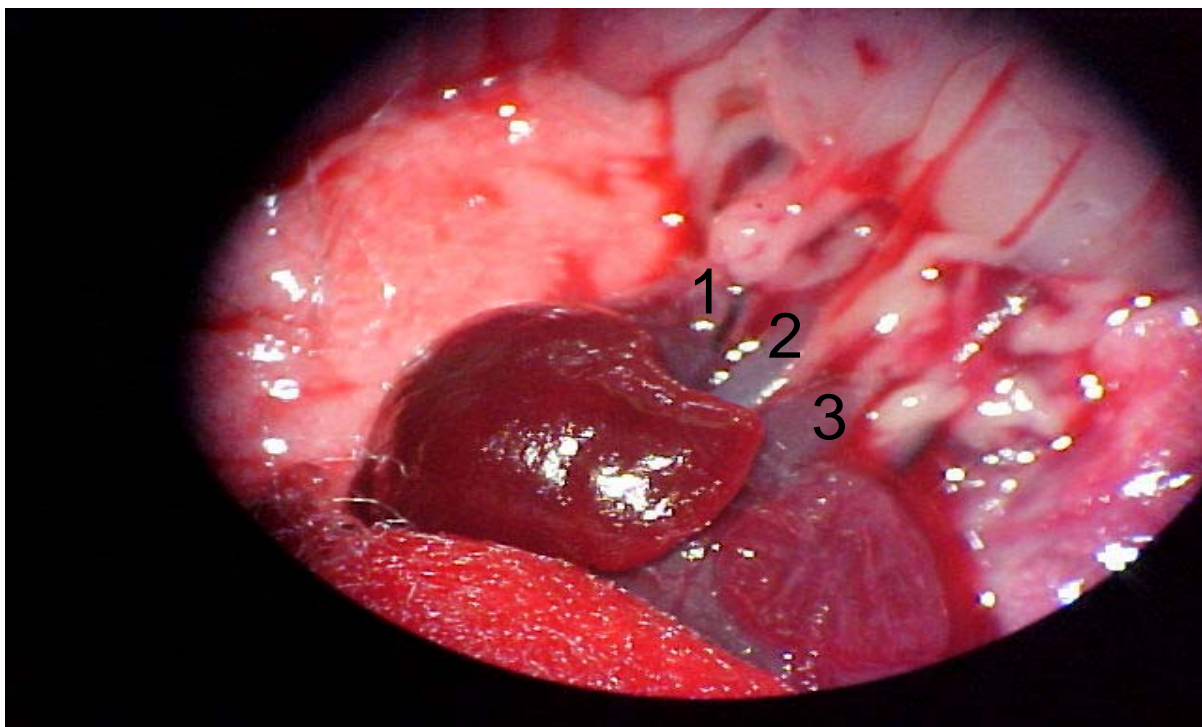
Transplante cardíaco: preparação do receptor - posicionamento dos clampes logo abaixo das veias e artérias renais, e logo acima da emergência das íliacas (16 X).



-
- 1 – Veia cava inferior;
 - 2 – Aorta abdominal;
 - 3 – Clampes vasculares de 5 mm.

Fotografia 3

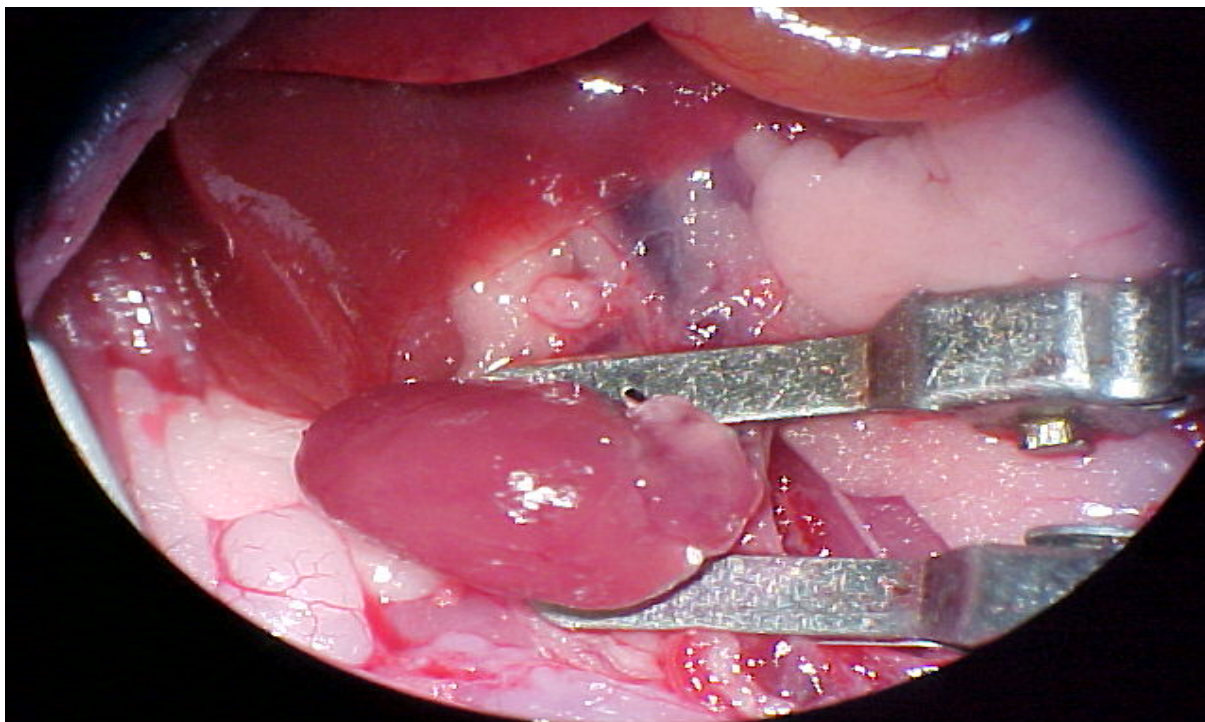
Transplante cardíaco: preparação do doador - ligadura da veia cava superior e visualização da aorta e artéria pulmonar (16 X).



-
- 1 – Veia cava superior ligada com fio 7-0;
 - 2 – Aorta;
 - 3 – Artéria pulmonar.

Fotografia 4

Transplante cardíaco: implantação do enxerto cardíaco - anastomose término-lateral da aorta do doador com a do receptor e anastomose término-lateral da artéria pulmonar do doador com a veia cava inferior do receptor (16 X).



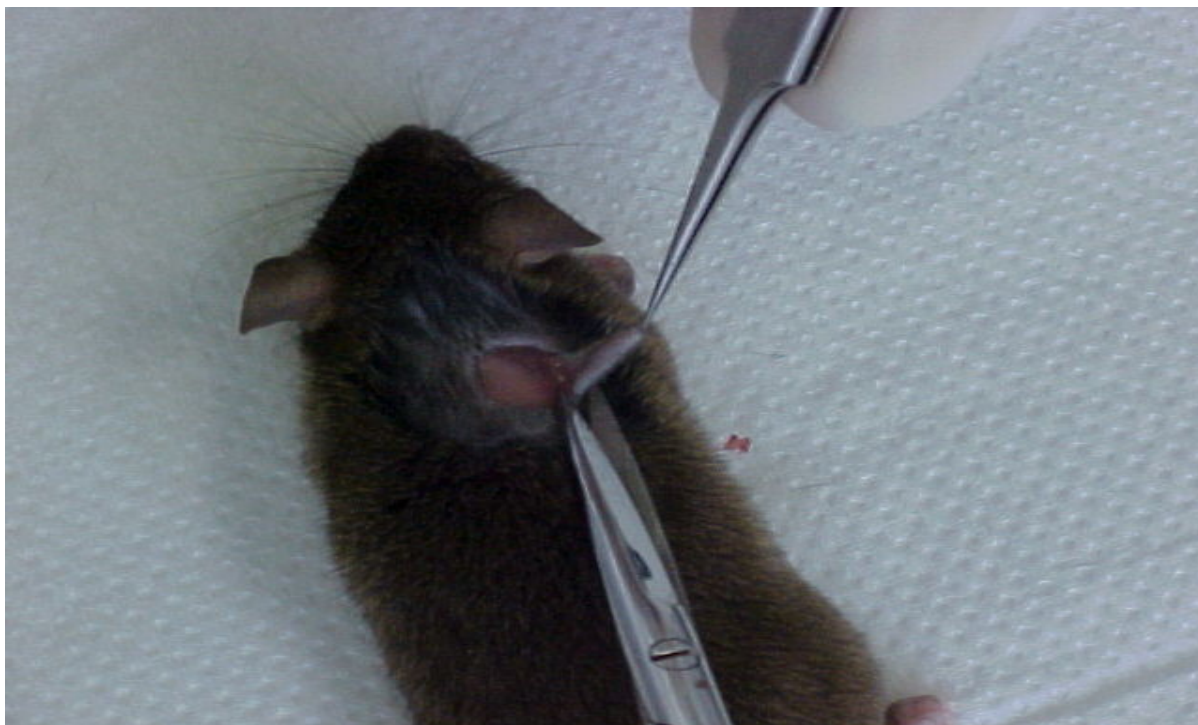
Fotografia 5

Transplante cutâneo: preparação do doador – retirada da pele caudal, tracionada distalmente (base-ponta).



Fotografia 6

Transplante cutâneo: preparação do receptor – retirada de 1 cm² de tecido cutâneo. na região tricotomizada do receptor, com uma pinça nº3 e uma tesoura fina reta para íris.



Fotografia 7

Transplante cutâneo: implantação do enxerto cutâneo – fragmento de pele caudal distribuído no seu leito receptor e mantido com sutura simples transfixante nas quatro extremidades do quadrado cutâneo enxertado.



Fotografia 8

Transplante cutâneo: isoenxerto cutâneo em um camundongo da linhagem C57BL/6N, seis dias após o transplante.



Fotografia 9

Transplante cutâneo: aloenxerto cutâneo em um camundongo da linhagem BALB/c, cujo doador era uma camundongo da linhagem C3H/HeJ (seis dias após o transplante).



ARTICLE: DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL TECHNIQUES OF HET-
EROTOPIC VESICULARIZED CARDIAC AND CUTANEOUS TRANSPLANT IN
MICE

Medical Sciences Post Graduation Program: Nephrology,
Medicine College, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. Brasil.

This study was sponsored by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and approved by Comissão de Ética and by Comissão Científica do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registered number GPPG- 98063.

Author address :

David Saitovitch

Hospital São Lucas

Av. Ipiranga, 6690, conj.204- 90610-000

Porto Alegre, RS- Brasil

Phone number: (55) (51) 3336-6046

e-mail:dsaitov@terra.com.br

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL TECHNIQUES OF HETEROTOPIC VASCULARIZED CARDIAC AND CUTANEOUS TRANSPLANT IN MICE

Patrícia Sesterheim¹

David Saitovitch²

Luis Felipe Gonçalves²

Abstract

This is an experimental study which objective is to develop and evaluate the feasibility of experimental techniques of heterotopic cardiac abdominal vascularized and cutaneous transplant in mice, creating an instrument of investigation for the effectiveness of the solutions of preservation, new immunosuppressive drugs, biological agents, genetic therapy and induction of immunology tolerance. The techniques used in this work were previously described by Corry *et al.* and Billingham *et al.* . The total surgical time length to perform the cardiac transplants (n=20), was at an average of $60.3 \pm 6,3$ minutes and to the cutaneous transplants (n= 20) $17.75 \pm 0,71$ minutes. The survival average of the cutaneous allografts (n=34) and cardiac (n=24) was 7 and 11 days respectively, while the syngrafts survived more than 100 days. Both techniques are characterized by the easy reproductivity of the experimental models. The differences between the techniques weren't limited either to the methodological models or the length of survival and vascularization, but, mainly by its immunogenicity, rejection susceptibility and resistance to the induction of immunology tolerance.

Key words: cardiac graft, cutaneous graft, immunology, syngeneic mice, transplant.

INTRODUCTION

At the present, the transplant of organs is the most efficacious therapeutic procedure in patients suffering from terminal organic dysfunction. The index success of renal transplant is to such an extent, that the survival of patients and their grafts is higher than 90 and 80% , respectively at the end of the first year, in the majority of the bench mark transplanting centers of the world (1). These figures represent a great progress when compared to those obtained since the beginning of the modern age of the transplant of organs from the 50's to the beginning of the 80's (2).

However, this therapeutic option has still been a clinic-surgical challenge, since several relevant questions are still pending in this field (3). Keeping the allograft requires the permanent use of immunosuppressive drugs, which increase the incidence of tumors and opportunistic infections, but they don't obstruct the process of rejection completely, that is still the main reason of late graft loss. A most attractive alternative would be the procedure of specific immunosuppres-

sion procedure that would make the receptor tolerant to the donor's antigens without being necessary a continuous immunosuppression (4).

For more than a century, experiments in animals triggered the organ transplants (5). Throughout original techniques, Carrel, in 1902, got brilliant results in the transplant of blood vessels, organs and limbs, when he developed the vascular anastomosis technique, making the transplant of solid vascularized organs possible like kidneys and heart (5,6).

Although the techniques of transplant of different organs and tissues are well determined, the greatest challenge remaining is still the immunology barrier, stimulating scientists to search for new challenges in the xenotransplant field of the transgenic, of the pharmacology and the development of methods of immunology tolerance induction (3).

Trying to understand and overcome the rejection processes, investigations made since the 50's, showed the importance of isogenic mice in the study of basic immunology, of the immunopathology of transplants and immunosuppression (7,8), since these strains allow to control and foresee the immunology events in experimental allotransplant and study the antigenic stimuli during the process of rejection, besides the surgical transplant techniques, its physiology and the immunology tolerance induction (9). It is important to point out the evaluation of the role of the individual loci of the MHC in the allorecognition as well as in its tolerogenic potential (10).

This experimental work aims at developing experimental techniques of heterotopic vascularized and cutaneous cardiac abdominal transplant in mice having the objective of using them as instrument of study of the immunologic mechanisms which encompassed in allorecognition, in the assessment of new immunosuppressive drugs or biologic agents and in the tolerance induction.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

It was used isogenic mice of the C3H/HeJ(H2^k), C57BL/6N (H2^b) and BALB/c(H2^d) strains to develop this study, bred and kept in conventional breeding in colony at *Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA) do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CDCT da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul.*

All of the animals were male aged between 8 and 10 weeks. Before and during the experimental phase, these animals were fed with standard balanced ration for rodents, received *ad libitum* water and were kept in individual tagged cages, with photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark (06:00 am/06:00pm).

All the procedures made, during the techniques, related to the animals, are in accordance with what is preconized at *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*, taken undue credit the State Constitution Law number 11.915, article 82,section IV dated May 21,2003(11)

HETEROTOPIC CARDIAC TRANSPLANT

In order to develop the experimental heterotopic vascularized cardiac transplant model in mice, the previous described technique by Corry (12) was used. It was necessary a microsurgery microscope (Nixon® “Stereo microscope teaching system”, SMZ-U model) as well as compatible instruments, previously described) to perform the microsurgery, previously subjected to autoclave.

It was used 92 animals, donors and receptors, amounting to 22 syngrafts and 24 allografts (Tables 1 and 2).

ANESTHESIA

After having been weighed in an analytical scale (Marte®, AM220), the mice were anesthetized under a final solution of xilazine hydrochloride 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) and ketamine hydrochloride 10% (Dopalen, Agribbrands Brasil Ltda) diluted at 2mg/ml and 10mg/ml in saline solution (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs do Brasil Ltda.) respectively. It was administrated a unique dose of 0,1ml for each 10g of corporal weight made by intraperitoneal mode.

The xiphopubica trichotomy , with an electrical trimmer and skin anti-sepsis with alcohol ethylic 70% , was made at the preoperative stage in all animals (donors and receptors) after the anesthesia.

After the anesthesia and trichotomy, donor and receptor were attached by the claws, in dorsal decubitus, with adhesive plaster (Cremer®), on heating plaque at a temperature of 37C.

PREPARATION OF THE RECEPTOR

Under a microscope enlarged 16X and with a thin straight pair of scissors and a dentiform dissection forceps, was made an abdominal approach throughout a medium xiphopubica laparotomy and, with an Alm retractor of 70mm (Downs® Downs Surgical Ltd., UK). An abdominal opening of 4cm was made.

A dampen gauze with saline solution 0,9% was placed above the abdominal opening where, using flexible shafts with cotton extremities (Cotonetes®, Johnson & Johnson), the viscera were restrained upward and to the right by divulsion and, carefully, involved with gauze,, been possible to see, consequently, aorta and inferior cavum vein (ICV). The performance was undergoing, subtly with iris forceps number 05, the dissection of the lumbar veins which were linked with 7-0 thread (Pearsalls Sutures®, Somerset, UK), performing a definitive hemostasis in three of the vessels, enough to provide a good drape (Photo 1) .

Aorta and ICV were kept in contiguity, besides not interfering in the preparation of the anastomosis , the dissection of the intervacular station would increase, unnecessarily, the surgical time length, besides possibly causing the fragility of the ICV wall and bleeding.

Vascular Clamps of 5mm (Scoville Lewis®, Downs Surgical Ltd., UK) were positioned right below the renal veins and arteries, and right below the iliac emergency (Photo2). Finally, aortotomy and venotomy were performed, adjacent to each other, taking into consideration the spatial relation between the pulmonary artery exit (PA) and aorta, using a 24G thin needle and extended with a pair of straight microscissors of 85mm. At this time, with the vessels just repaired, the incision was covered with dampen gauze and the receptor was placed aside while the donor's heart was isolated

PREPARATION OF THE DONOR: HEART REMOVING

With the animal in dorsal decubitus, already anesthetized, the abdominal approach was the same as of the receptor.

It was made a sodic heparin solution in the ICV (Liquemine®, Roche Brasil), 10UI/10g corporal weight, diluted in saline solution. After having taken off the needle (24G), exsanguination happens through the orifice left by it.

In order to expose the thoracic cavity widely, with a pair of scissors, an opening and resection in the anterior wall was made by bilateral paraexterior section, followed by manual dislocation of the costovertebral articulations and bilateral diaphragmatic incision .

Individually, distal ICV, proximal superior cavum vein (SCV) and azygous vein were linked by a thread of suture 7.0 and sectioned with straight microscissors.

Aorta vein was previously sectioned to the brachiocephalic artery, the thoracic artery was previously sectioned before the bifurcation (Photo 3).

In order to complete the heart liberation, it was attached, in bloc, with a 7-0 thread, (Prolene, Ethicon®), the thoracic veins, letting the aorta and PA free and having a repairing thread to help to deal with it. The heart was gently detached from the donor's thorax and placed in a Becker (50 ml.) with saline solution at 0,9% to 4° C. To maintain the temperature, while the receptor is replaced, the Becker was kept in dry ice.

IMPLANTATION OF THE CARDIAC GRAFT

The donor's heart was taken off the saline solution and placed on the receptor's abdomen so that the ligature in blocs was kept, during the surgery, by the cranio to the receptor. During the cardiac graft implantation, it was permanently dropped with saline solution (4° C) for its protection.

We started by terminus lateral anastomosis of the donor's aorta with the receptor. A stitch was made at the proximal extremity of aortectomy and another one at the distal extremity, from these procedures it was initiated the simple continuous suture on one side of the formed ellipse, finishing at the proximal extremity. The same procedure was repeated on the other side of the ellipse. The same technique was used to the anastomosis of the PA with the IVC. Both vascular anastomoses were made by using a 10-0 suture thread, 0,07 mm needle (Ethilon®, Surgicon Ltd, VK).

Having finished the anastomoses (Photo 4), they were surrounded with hemostatic sponge (Gelfoam®, Pharmacia & Upjohn Co., EUA) and the clamps were taken off, firstly the proximal and then the distal. The perfusion is made with blood stemming from the receptor's abdominal aorta that enters in a retrograde direction, by the receptor's aorta. Due to the antireflux competence of the aortic valvule, it gets into the coronary artery of the graft; perfuse the myocardium, and returns to the atrium and right ventricles through the coronary veins, and then to the thoracic artery, still in the donor's heart, passing to the receptor's abdominal cavum vein. It is a non-functional model of transplant non functional, since the cardiac cavities don't receive blood.

After the anastomoses, the viscera were replaced in the abdominal cavity, using cotton shafts, around the graft. The muscular and cutaneous plans were sutured with 7-0 thread (Prolene, Ethicom®), the adhesive plasters were removed which were attached to the claws and the animal was kept on the heating plaque for more than 2 hours. Finally the receptor was placed in an individual cage maintaining the habitual manipulation by the breeding in colony at CPEA.

REJECTION DETERMINATION

The function of the cardiac graft was daily monitored, up to 100 days of the transplantat, through direct abdomen palpation, by 2 or more investigators.

CUTANEOUS TRANSPLANT

In order to develop the experimental cutaneous transplant model, it was made the described procedure by Billingham and Madawar (13,14). For this, it was used 21 donors and 64 receptors between the different strains, been made 30 iso-grafts and 34 allografts (Tables 3 and 4).

ANESTHESIA

The receptor mice were, after being weighed on analytic scale, anesthetized with a final solution of xilazine hydrochloride 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) and ketamine hydrochloride 10% (Dopalen®, Agribbrands Brasil Ltda.) diluted at 2 mg/ml and 10 mg/ml of saline solution (0,9%) respectively. It was given a unique dose of 0,05 mL for each 10 g of corporal weight by intraperitoneal mode (ip), enough to terminate the pain and perform the procedure at apt time of 15 minutes.

PREPARATION OF THE RECEPTOR

After the anesthesia, it was performed the dorsolateral trichotomy (4 cm²) with a trimmer machine (Oster®, USA) followed by antisepsis with etilic alcohol 70% and the animal was placed in dorsal decubitus.

PREPARATION OF THE DONOR

It was performed the euthanasia in the donor by cervical dislocation preconized by law 714, June 20, 2002, that determines the procedures and methods of euthanasia in animals from *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, and by *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)* (15,16).

The skin from the base of the animal's tail was sectionalized, transversally with bistoury blade number 24 (Solidor®) and then, longitudinally. By using a dissection forceps, the skin was distally tractioned (base-extremity) taken off from the animal (Photo 5) and submerged in saline solution 0,9% at 4° C.

IMPLANTATION OF THE CUTANEOUS GRAFT

On the receptor's trichotomous region, with forceps number 3 and a pair of thin straight iris scissors, it was taken off 1cm² of cutaneous tissue (Photo 6). With the bistoury blade, it was sectionalized 1cm² of the total skin from the donor's cauda. Using a pair of forceps, the caudal skin fragment was distributed in its receptor bed and kept with simple suture transfixed on the four extremities of the grafted cutaneous square (Photo 7).

Recovered from anesthesia, the animal was placed in an individual cage keeping the habitual manipulation made at breeding in colony at CPEA.

REJECTION DETERMINATION

The animals were daily observed, until 100 days of the transplant and the rejection was confirmed due to the observation of the combination of some features: cyanosis, erythema, erosion and finally, total loss of the cutaneous graft.

RESULTS

HEROTROPIC VASCULARIZED ABDOMINAL CARDIAC TRANSPLANT

By analyzing one animal sample (number 20) chosen at random, it was observed that the total surgical time length to perform the transplants was at an average of $60,3 \pm 6,3$ minutes, taken $22,9 \pm 3,1$ minutes to prepare the receptor, $11,1 \pm 1,5$ minutes to liberate the donor's heart and $26,3 \pm 3,6$ minutes to prepare the anastomoses (Picture 1).

In a total of 22 cardiac isotransplants performed, through direct palpation, it was observed that after 4 hours of transplantation one of the animals (4%) didn't present the graft beating, dying 5 hours after the verification. In another one, paraplegia occurred, observed after the end of the anesthetic effect (animal number 2) (Picture 2). Although the graft beating was noticed, due to this paralysis and the suffering presented, the euthanasia, in these cases, is recommended and performed 48 hours after the transplant. The others mice (20 animals) and their respective grafts (91%) survived for more than 100 days after the surgery (Picture 2).

However, of 24 cardiac allotransplants performed, presented the absence of cardiac graft beating in eight animals 10 days after the transplant, in twelve animals at the 11th day and four animals at the 12th day (Picture 2).

CUTANEOUS TRANSPLANT

To prepare the receptor of the cutaneous graft, the average time length taken, observed in a random sample (number 20) was $7,0\pm 0,9$ minutes; between the euthanasia and the removal of the donor's cauda skin was taken $5,00\pm 0,8$ minutes and the implantation of the cutaneous graft, $5,75\pm 0,71$ minutes, having an average of $17,75\pm 0,71$ minutes for the total surgery time length (Picture 3).

In picture 4 is observed that, in the 30 cutaneous isotransplants performed, there wasn't rejection (Photo 8) However, among the 34 allotransplants, nine grafts were rejected at the 6th day (27%), twelve at the 7th day (35%) and thirteen cutaneous grafts rejected at the 8th day (38%) (Photo 9).

DISCUSSION

The mouse is the chosen experimental animal, in several fields, because it is easy to breed and manipulate, it has a fast reproduction, docile behavior, resistance to infections and surgical traumatism, wide genetic diversity, big biological similarity and anatomical disposition of the inner structures, when compared with human species. Besides, it is estimated that the homology of the DNA codifier, between these two species, is contained between 70 to 90% (7,9,17).

The isogenic strains, by crossbreeding between brothers, within, at least, 20 generations, originating populations of mice genetically identical (8), constitute one of the major advantages of using this model for the study of immunological mechanisms (8,9).

For that reason, the laboratory animals, particularly the mice, are widely used for the development of experimental transplant models, mainly cardiac, renal and pancreatic islet.

The researchers Robert Corry, Henry Winn and Paul Russel, in 1973, recognized the importance of using isogenic strains to understand the immunology events, they developed an experimental murine cardiac model similar to the one which was experimentally registered to cardiac allografts in rats, by Ono and Lindsey, in 1969 (12,18). Just as the cutaneous transplant, nowadays, this is the experimental model mostly used in biomedical researches (19,20,21).

The experimental heterotopic vascularized cardiac transplant in mice, described by Corry *et al.* and developed in this study, although it can only be performed by one surgeon, needs a previous microsurgical training, four months, to acquire the manual ability, since, dealing with a small animal ($\pm 35g$), it is necessary that, besides the microscope, the usage of a specific instrumental for microsurgery. Technical failures are responsible for animal death at the first 72 hours after the transplant (9). Nevertheless, just as it was reported by Corry, the success of the technique is nearly 90% (Picture 2).

Another limiting factor of mice transplant is the anesthesia. Small animals such as rats, mice or hamsters have a relatively high metabolism, thus needing a higher anesthesia dose, when compared with bigger species. There is still the difference in using the anesthetic, also, among different strains of the same species. Because of this, there are two factors that make the anesthesia in mice more difficult: the low corporal weight increasing the overdose risk, generating hypothermia, and several times the death; and the different strains which metabolize in a differentiated way the anesthetic agents. Thus, the standardization and appliance of the doses among distinct strains of isogenic mice, for a surgical time length average of one hour ($61,14 \pm 7,31$ min), must be very flexible (22).

The vessels (1-3mm diameter), and the other structures of mice, have reduced size and are extremely delicate (23). Even cotton shafts, if caused attrition against the IVC walls and abdominal aorta, may get fragile and cause bleeding. It is necessary to have a double care during the dissection of the lumbar veins for definitive hemostasis. This procedure is performed with straight iris forceps, and due to the sensitivity of these vessels, any touch made with the forceps may be enough to cause a rupture and hemorrhage. The same care must be taken during the ligatures of the veins and arteries in order to liberate the donor's heart. A small contact with the forceps, with the atrium and ventricles may cause imperceptible perforations up to the time that the graft, once in anastomosis, is perforated leading to the technique failure and, consequently, the animal death.

The incidence of paraplegia (number 1) was associated with the time of medullar AVC near to 60 minutes (Picture 1). This complication is, generally, controlled by increasing the ability with the technique and decreasing the surgical time length.

This experimental transplant model has the advantage of allowing the immediate assessment of the graft function by the immediate visualization of the cardiac beating, outlining the success of the technique (9). However, occasionally, it is necessary to massage the cardiac graft until the normal rhythm is restored – the cardiac graft is perfused with oxygenated blood stemming from the receptor's abdominal aorta which gets into the coronary graft artery and returns to the atrium and right ventricle and then to the drained pulmonary artery to the receptor's inferior cavum vein.

Although this perfusion is kept within the graft survival, lack of left ventricular filling occurs, (19) leading to hypotrophy of the isolated cardiac muscle. The graft cardiac contraction is monitored, through direct palpation on the abdomen, made daily, some times it may be confused with the transmission of the donor's aorta pulsation (24). Very strong artery beatings may mean obstruction, in the same way as the ingurgitating of the vein (25).

Just as the murine experimental cardiac model, the cutaneous transplant is widely used in researches that aim at deepen the understanding of the immunology of transplants, mainly the mechanisms involved in rejection and its prevention and treatment (9,14).

The cutaneous transplant technique, developed in this study, was established and standardized by Billingham and Medawar, in 1951, important step for the study of the immunologic base of rejection to the allograft (13,26).

The cutaneous grafts are an excellent manner of identifying the histocompatibility between donor and receptor, this technique, is widely used in breeding in colony to assess the syngeneic in animals colonies *inbred* (8,23).

This technique has the advantage of being simple and fast, it may be performed in series, since the time between the graft takeoff and its transplantation isn't higher than 20 minutes (Picture 3). Another advantage is the performance of an average of 5 transplants with the skin cauda of a unique donor. Besides, the short period of anesthesia demands a smaller dose of anesthetics, and the animals is not in risk (14,22).

The survival, or the graft rejection, is easily monitored (visual assessment), based on the skin appearance; showing well defined features of acute and chronic rejection (26). The acute rejection occurs, usually at the first week after the transplant (Picture 4) and the graft presents dilated vessels and cyanosis, followed by cutaneous erosion. On the other hand, the chronic rejection, may take weeks or even months, depending on the histocompatibility between donor and receptor (13,26).

Nevertheless, this technique has some limitations. It is well determined that avascular grafts are subject to AVC degeneration that may lead to inflammation and

necrosis, even when syngenic. However, it is been demonstrated that nonvascular cardiac are rejected more slowly, and sometimes they are not rejected than cutaneous grafts between the same combinations of strains (21). Because of this, the difference in the vascularization mode, does not seem to be the only difference in the survival of the cutaneous graft (7th day).

The differences between the techniques are not limited to the methodological or vascularization complexities, but mainly to the effector mechanisms, susceptibility to rejection or resistance to the induction of immunology tolerance (29-31).

The existence of a hierarchical susceptibility to rejection of different allografts (skin, pancreatic islets and heart), is well defined, however the responsible mechanisms are unknown.

Although the cardiac graft stimulates the activation of a much bigger number of T alloreactive cells than the cutaneous graft, the skin presents higher susceptibility to rejection and higher resistance to the tolerance induction (21). On the other hand, Sun *et al.* have demonstrated that the bigger the allograft mass is, the bigger may be its survival. An unique heart or kidney transplanted, between rat strains, suffers acute rejection, in a short time; however the simultaneous transplant of two hearts or two kidneys in a unique receptor results in a higher survival of these allografts (32).

Studies suggest that the microenvironment and the antigenic graft charge may have an important role to determine the susceptibility to rejection of one allograft and resistance to induction to immunology tolerance (21,27,32). Besides, another explanation to de higher susceptibility of the skin to rejection (and smaller to

tolerance induction), is the presence of antigenic specific- tissue, to which the central tolerance (thymic) was not developed by the receptor (21).

This is the biggest difficulty in induction of immunology tolerance of the cutaneous graft, together with the easiness of its performance that makes it an interesting experimental model and clinic relevance when compared with vascularized models.

Unfortunately, there aren't safe and reproductive means of immunology tolerance induction, in the transplant context, in human beings. Nevertheless they present limitations, the murine experimental models developed in this study and the amplification of animal models such as Knockout and transgenic, constitute important tools to the advance of knowledge of immunology mechanisms constituting in the allorecognition and production of tolerance.

REFERENCES

- 1 MORRIS, P.J. Results of Renal Transplantation. In:_____ *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1994,p. 504.
- 2 DANOVIATCH, G.M. Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. In:_____ *Handbook of Kidney Transplantation*. Brown and Company, 1996,p. 55.
- 3 BAPTISTA-SILVA, J.C.C. Transplante renal. In: _____. *Cirurgia Vasculiar e Transplante Renal: Guia Ilustrado*. São Paulo: Bapbaptista, 2001. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>> Acesso em: 20 out. 2003.
- 4 NOVELLO, R. *Avaliação da Influência da Injeção Intratímica de Antígenos do Doador e Imunossupressão Inespecífica em Aloenxerto de Pele*. São Paulo: SBN, 2000. p. 83.
- 5 KÜSS, R. BOURGET, P. *An Illustred History of Organ Transplantation*. Laboratories Sandoz. Rueil-Malmaison, France, 1992. p. 1-35.
- 6 CARREL, A. Results of Transplantation of Blood Vessels Organs and Limbs. *JAMA*1908;51:1662-7.
- 7 SOARES, M.B.P; CARVALHO, L.C.P.; SANTOS, R.R. Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados: uma Estratégia para a Preservação. Rio de Janeiro: *Biotec Ciênc e Desenv* , mai./jun. 2001.n. 20.
- 8 ANDRADE, A. PINTO, S.C.; DE OLIVEIRA, R.S. ET AL. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 388.

- 9 BUENO, V.; PESTANA, J.O.M. *Modelos Experimentais de Transplante de Órgãos*. São Paulo: UPM, 2000. Disponível em: <<http://www.mackenzie.com.br>>. Acesso em: 18 jul. 2000.
- 10 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.L.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 4 ed. p.544.
- 11 RIO GRANDE DO SUL. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. *Constituição do Estado*, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.
- 12 CORRY, R.J.; WINN, H.J.; RUSSEL, P.S. Primarily Vascularized Allografts of Hearts in Mice: The Role Of H-2D, H-2K and Non- H-2 Antigens in Rejection. *Transplantation*, v.16, n. 4, p. 343-8,1973.
- 13 BILLIGHAM, R.E.; MADAWAR, P.B. The Technique of Free skin grafting in mammals. *J Exp Biol*, 1951. 28:385-402.
- 14 GREEN, M.K.; MANDEL, T.E.; Skin Grafting in mice: Indicators of Cell-Mediated and Humoral Immunity. In: LOVELAND, B.E.; HENNING, M.M. *Experimental Transplantation Models in Small Animals*. Hardcover: Dunitz Martin Ltda, 1995. p. 195-14. cap IX.
- 15 BRASIL. Lei 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, art 16, 20 jun. 2002.
- 16 COBEA. *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: Legislação e Ética*. São Paulo. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 20 mar. 2002.
- 17 GODARD, A.L.B O Espelho Milagroso: O Poder Do Camundongo. Agência Brasil: Ciência & Tecnologia, 11 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.radiobras.gov.br/ct/>> Acesso em: 20 dez. 2003.
- 18 ONO K, LINDSEY E. Improved Technique of Heart Transplantation in Rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;57(2):225-9.
- 19 ABBOTT, C.P.; DeWITT, C.W.; CREECH. O.Jr. The Transplanted Rat Heart: Histologic And Electrocardiographic Changes. *Transplantation*, 3: 432-445, 1965.
- 20 ROSZ, C.G.; WAKELY, M.E.; BUMGARDNER, G.L.; WERINGER, E.J. Experimental Models in Transplantation. In: PARNHAM, M.J. In: *Progress in Inflammation Research*. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1998.
- 21 JONES, N.D. Differential Susceptibility of Heart, Skin and Islet Allografts to T Cell-Mediated Rejection. *The J Immun*, 2001, 166: 2824-2830.

- 22 SVENDSEN, P. Laboratory Anesthesia. In: _____; HAU, J. *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Florida: CRC Press, Inc., 1994, cap. 19.p. 435.
- 23 STEINBRÜCHEL, D.A. Laboratory Anesthesia. In: SVENDSEN, P.; HAU, J *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Florida: CRC Press, Inc., 1994, cap. 22. p.435.
- 24 SAITOVITCH, D. *Transplantation tolerance: an Experimental Model Exploring Mechanisms of its Induction and Maintenance After Pre-Treatment with Donor Antigen and Anti- CD4 Antibodies*. Oxford: University of Oxfor, 1995.p. 207.
- 25 PESSOA, B.B.G.P.O Retalho Hipogástrico Cutâneo no Cão: Modelo Para O Aprendizado Experimental de Microcirurgia. São Paulo: *Acta Cir Bras*,2002. vol. 17 n.3.
- 26 KLEIN, J. *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex: Principles of Immunogenetics applied to a Single System*. New York: Springer-Verlag, 1975 p.620.
- 27 MEDAWAR, P.B. The Behaviour and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits. *J Anat*, 1944, 78:176.
- 28 YOUSSEF, A.R.; OTLEY, C.; MATHIESON, P.W.; SMITH, R.M. Effector Mechanisms in Murine Allograft Rejection: Comparison of Skin and Heart Grafts in Fully Allogeneic and Minor Histocompatibility Atigen-Mismatched Strain Combinations. *Transplant Int* 2002, 15(6): 302-9.
- 29 PHILLIPS, N.E. et al. Blockade of CD40- Mediated Signaling Is Sufficient for Inducing Islet but not Skin Transplantation Tolerance. *The J Immun*, 2003, 170: 3015-3023.
- 30 GODDARD, S. et al. Interleukin-10 Secretion Differentiates Dentric Cells from Human Liver and Skin. *Am J Pathol*, 2004, 164 (2):511.
- 31 HASEGAWA, S. et al. Pattern of Graft- and Host-Specific MHC Class II Expresión in Long-Term Murine Cardiac Allografts. *Am J Pathol*, 1998, 153: 69-79.
- 32 SUN, J., G. W.; MCCAUGHAN, N. D.; GALLAGHER, A. G. R.; SHEIL, G. A. BISHOP. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation*, 1995, 60:233.

Table 1

List of mice strains used to develop the technique of heterotopic isograft cardiac vascularized abdominal.

Donor	Receptor	Haplotype	Number of transplants
C3H/HeJ	C3H/HeJ	H2 ^K	6
BALB/c	BALB/c	H2 ^d	8
C57BL/6N	C57BL/6N	H2 ^b	8

Number of animals used: 44
n=22

Table 2

List of mice strains used to develop the technique of heterotopic allotransplant cardiac vascularized abdominal.

Donor	Receptor	Haplotype	Number of transplants
C3H/HeJ	BALB/c	H2 ^K - H2 ^d	8
BALB/c	C57BL/6N	H2 ^d - H2 ^b	8
C57BL/6N	BALB/c	H2 ^b - H2 ^d	8

Number of animals used: 48
n=24

Table 3

List of mice strains used to develop the technique of cutaneous isotransplant.

Donor	Receptor	Haplotype	Number of transplants
C3H/HeJ	C3H/HeJ	H2 ^K	10
BALB/c	BALB/c	H2 ^d	10
C57BL/6N	C57BL/6N	H2 ^b	10

Number of animals used: 39
n=30

Table 4

List of mice strains used to develop the technique of cutaneous allotransplant.

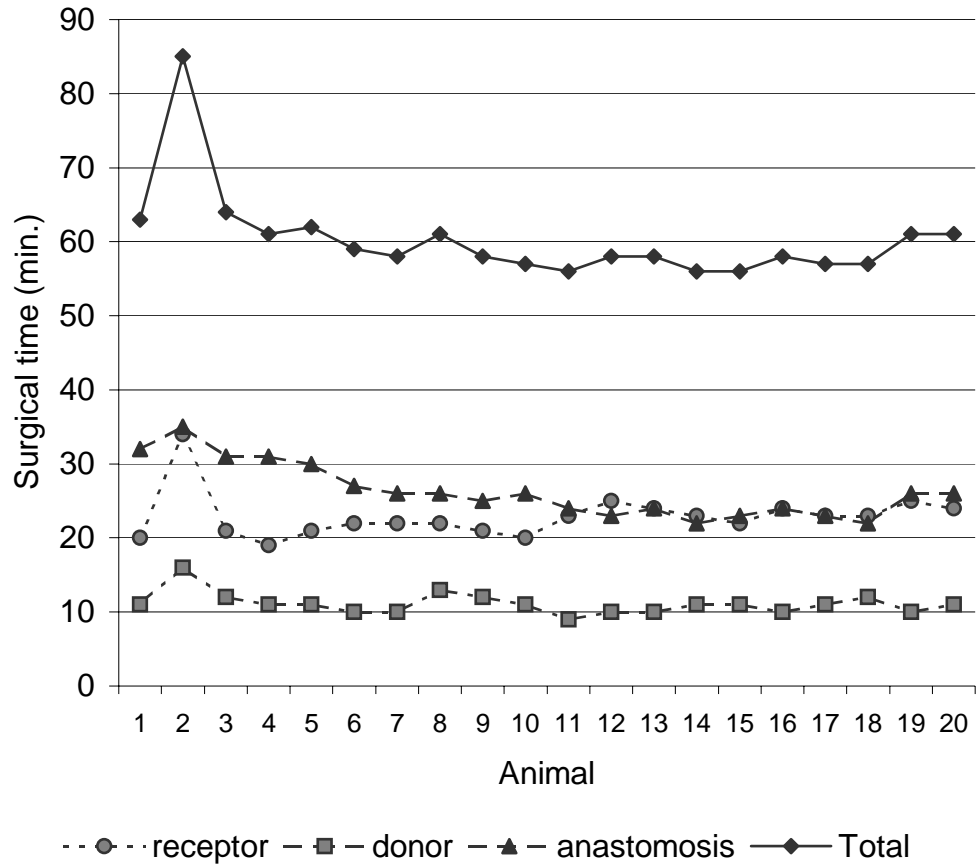
Donor	Receptor	Haplotype	Number of transplants
C3H/HeJ	BALB/c	H2 ^K - H2 ^d	10
BALB/c	C57BL/6N	H2 ^d - H2 ^b	12
C57BL/6N	BALB/c	H2 ^b - H2 ^d	12

Number of animals used:46

n=34

Picture 1

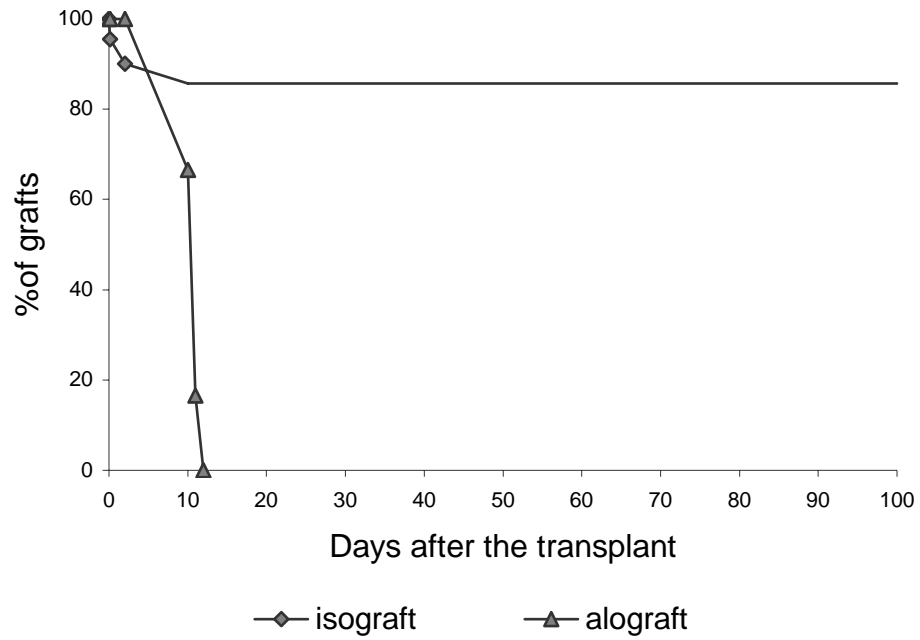
Surgical time length to develop the cardiac transplant in each animal.



Sample of 20 animals chosen at random to demonstrate the evolution of surgical time length according to the experimenter experience.

Picture 2

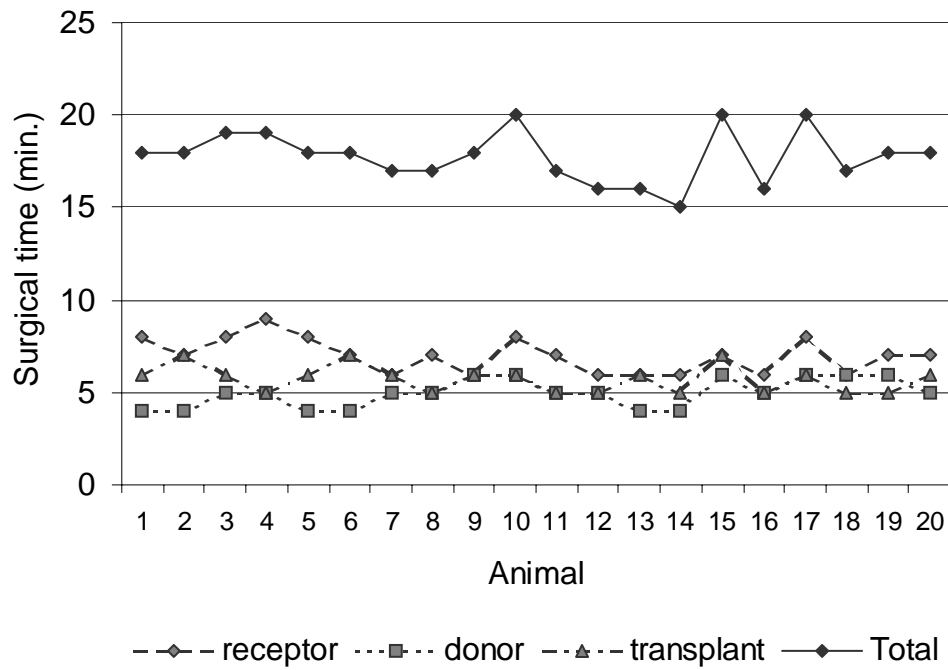
Graph of cardiac graft survival



n=22 isograft
n=24 allograft

Picture 3

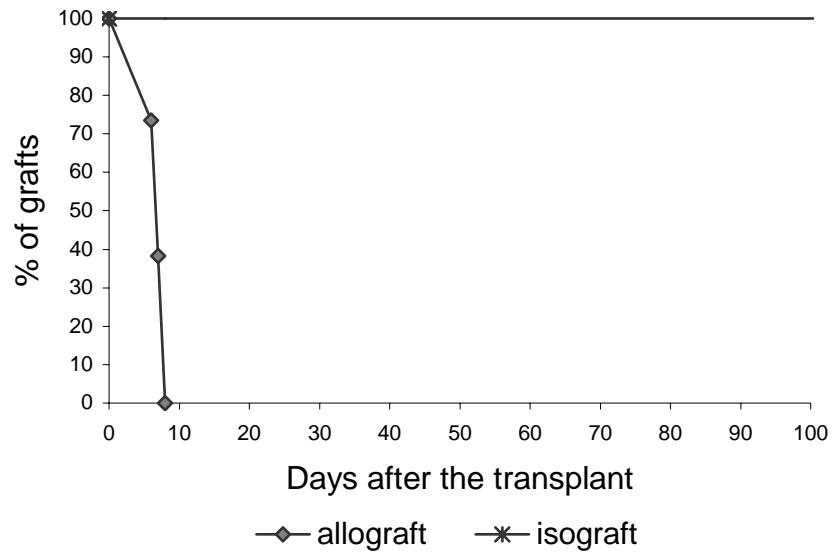
Surgical time length used to perform the cutaneous transplant in each animal.



Sample of 20 animals chosen at random to demonstrate the evolution of the surgical time length according to the experimenter experience.

Picture 4

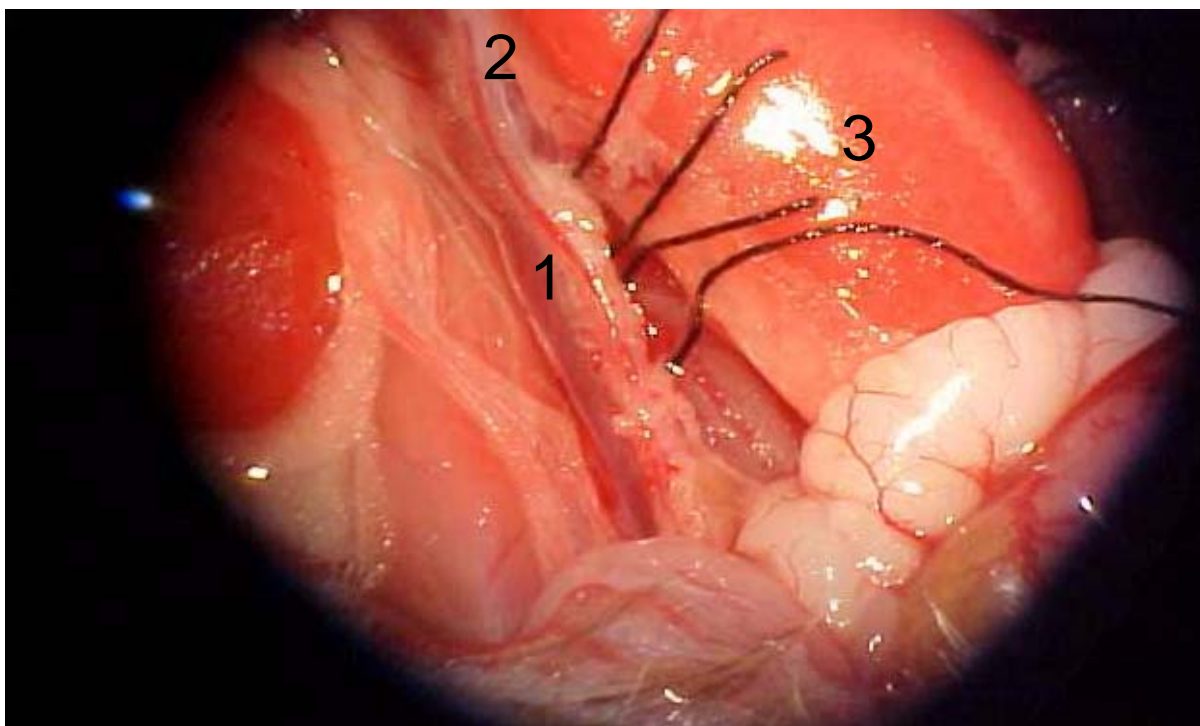
Graph of cutaneous grafts survival.



n=30 isograft
n=34 allograft

Photo 1

Cardiac transplant: receptor's preparation definite hemostasis in three lumbar veins, linked with 7-0 thread (16x).



*Critical step of the receptor's preparation – linkage of perforating vessels, moment at which the aorta and inferior cavum vein are prepared.

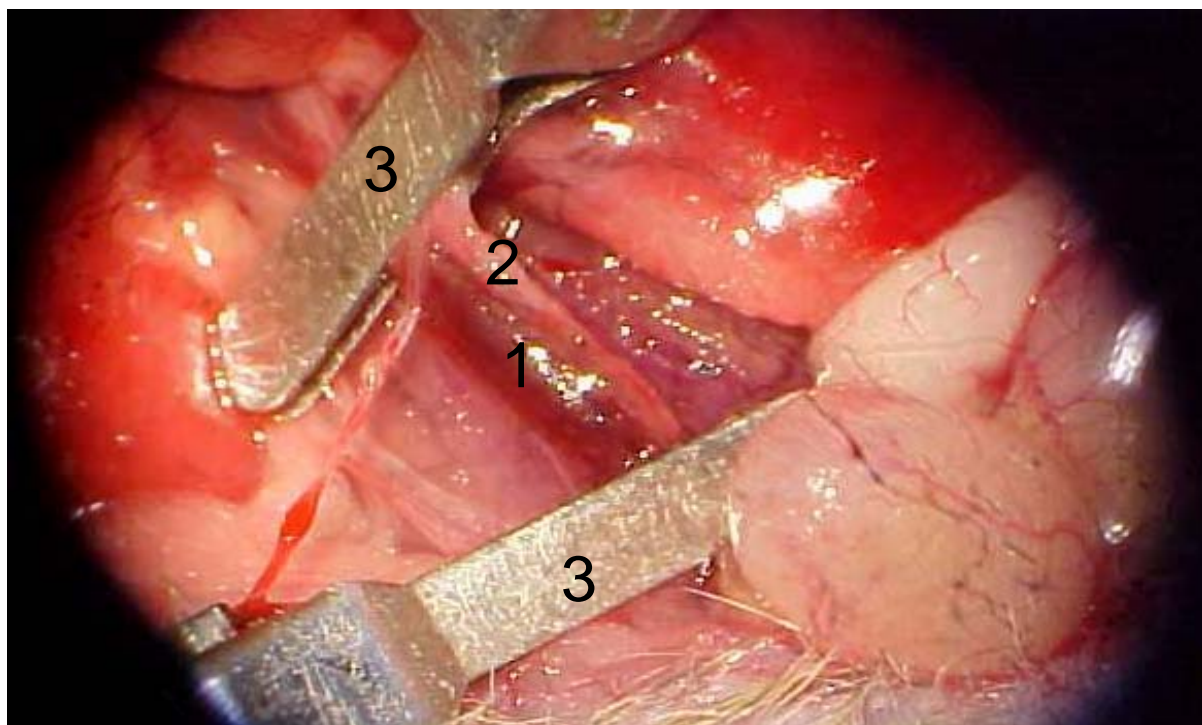
1 – Inferior cavum vein;

2 – Abdominal aorta;

3 – Left kidney.

Photo 2

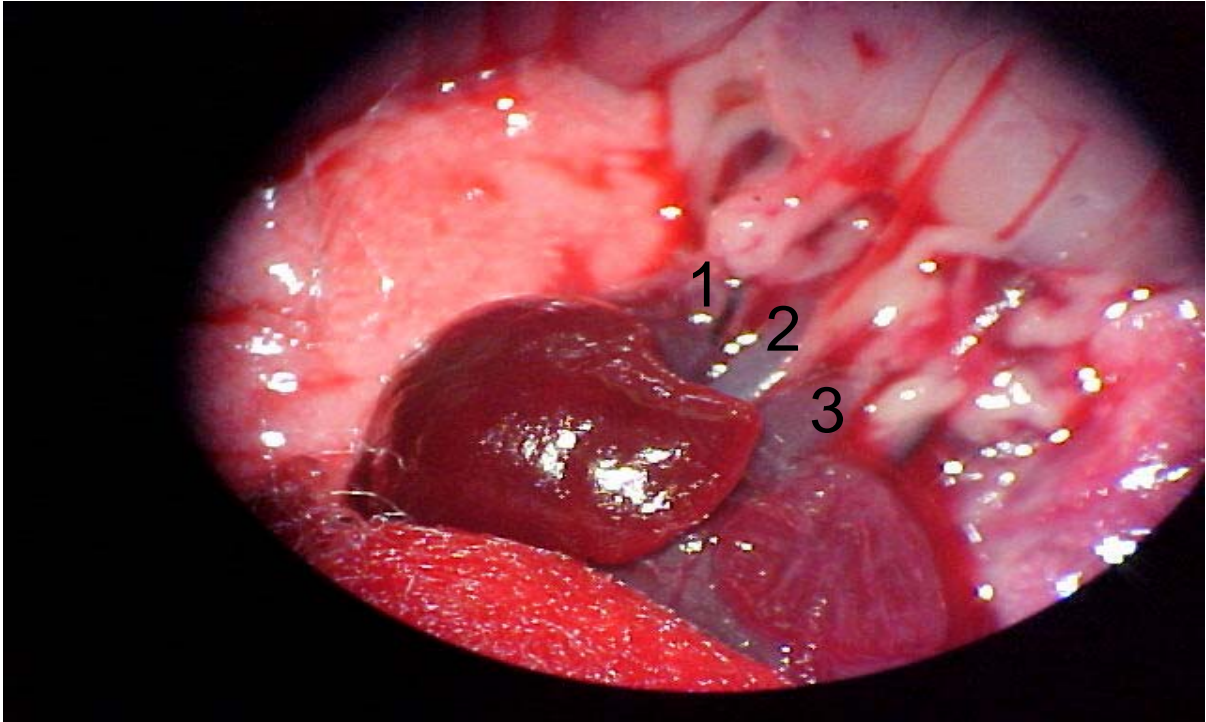
Cardiac transplant: receptor's preparation – clamps positioned right below the renal veins and arteries, and right above the emergency of the iliacs (16x).



-
- 1 – Inferior cavum vein;
 - 2 – Abdominal aorta;
 - 3 – Vascular clamps of 5 mm.

Photo 3

Cardiac transplant: preparation of the donor – ligature of the superior cavum vein and visualization of pulmonary aorta and artery (16x).



-
- 1 – Superior cavum vein linked with 7-0 thread;
2– Aorta;
3 – Pulmonary Artery.

Photo 4

Cardiac transplant: implantation of the cardiac graft – terminal- lateral- anastomosis of the donor's aorta with the receptor's and terminal-lateral anastomosis of the donor's pulmonary artery with the inferior vein of the receptor (16 X).

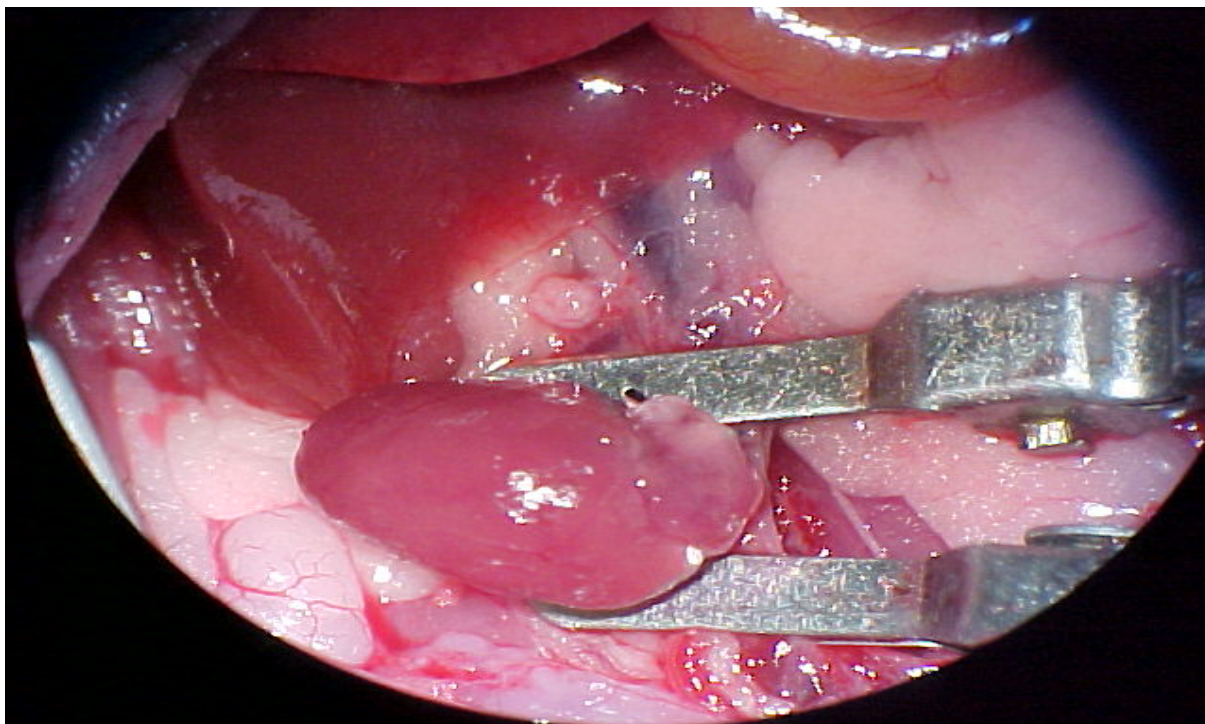


Photo 5

Cutaneous transplant: preparation of the donor – caudal skin takeoff, distally tractioned (base-extremity).



Photo 6

Cutaneous transplant: preparation of the receptor – taken off 1cm² of cutaneous tissue, in the receptor's trichotomous, with forceps number 3 and a pair of iris- thin- straight -scissors.

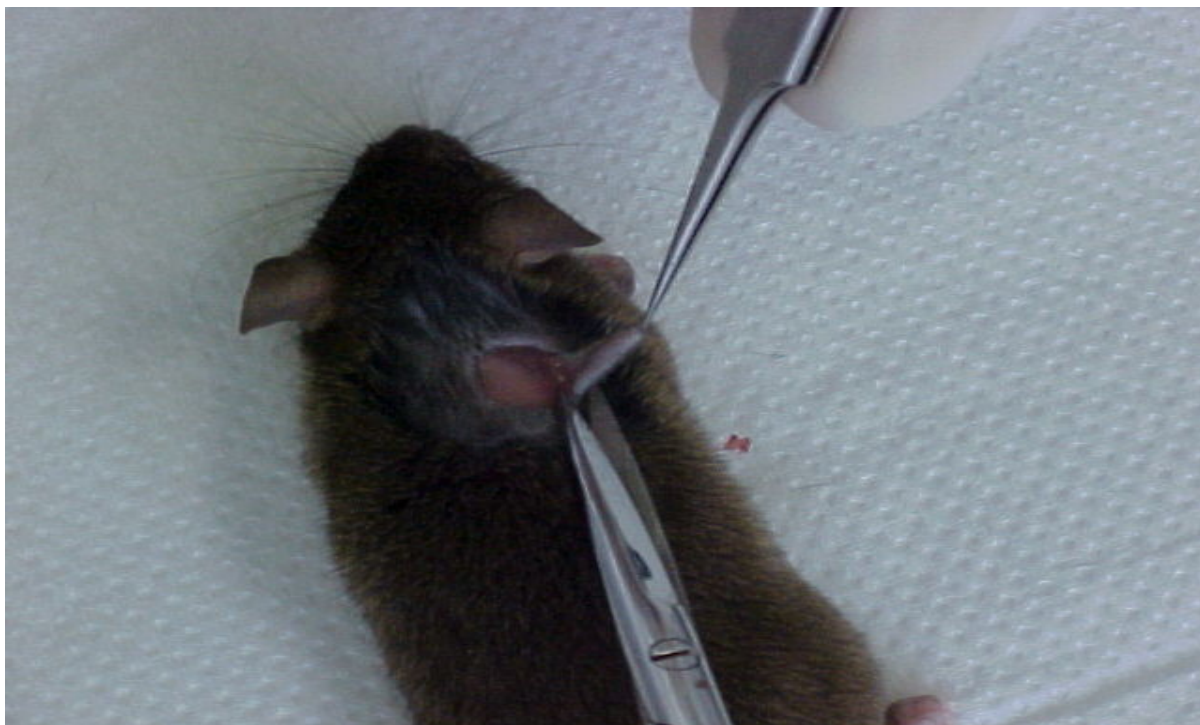


Photo 7

Cutaneous transplant: implantation of the cutaneous graft-caudal skin fragment distributed in the receptor's bed and kept with simple suture transfixing in the four extremities of the cutaneous graft square.



Photo 8

Cutaneous transplant: cutaneous isograft in a mouse of C57BL/6N strain, six days after the transplant.



Fotografia 9

Cutaneous transplant: cutaneous allograft in a mouse of BALB/c strain, whose donor was a C3H/HeJ mouse strain (six days after the transplant).

